



대한민국 특허청
KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원 번호 :
Application Number

특허출원 2001년 제 19645 호
PATENT-2001-0019645

출원 년 월 일 :
Date of Application

2001년 04월 12일
APR 12, 2001

출원 인 :
Applicant(s)

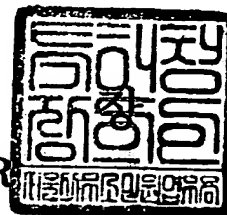
류왕식
RYU, WANG-SHICK



2001 년 07 월 11 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2001.04.12
【발명의 명칭】	유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터
【발명의 영문명칭】	Hepatitis B virus vectors for gene therapy
【출원인】	
【성명】	류왕식
【출원인코드】	4-2000-007603-9
【대리인】	
【성명】	이후동
【대리인코드】	9-1998-000649-0
【포괄위임등록번호】	2000-021928-8
【발명자】	
【성명】	류왕식
【출원인코드】	4-2000-007603-9
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이제한
【성명의 영문표기】	LEE, Je Han
【주민등록번호】	730504-1155729
【우편번호】	411-311
【주소】	경기도 고양시 일산구 강선마을 108동 1404호
【국적】	KR
【우선권주장】	
【출원국명】	KR
【출원종류】	특허
【출원번호】	10-2000-0021070
【출원일자】	2000.04.20
【증명서류】	첨부
【심사청구】	청구
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】	
【서열개수】	5
【서열목록의 전자문서】	첨부

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
이후동 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 56 면 56,000 원

【우선권주장료】 1 건 26,000 원

【심사청구료】 19 항 717,000 원

【합계】 828,000 원

【감면사유】 개인 (70%감면)

【감면후 수수료】 266,600 원

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 벡터에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 간 세포에만 특이적으로 감염하여 이중 유전자를 전달 및 발현할 수 있는 유전자 재조합 B형 간염 바이러스 벡터에 관한 것이다. B형 간염 바이러스는 간세포에만 선택적으로 감염하므로 본 발명에서 제공하는 재조합 바이러스는 간세포에만 선택적으로 감염하여 치료용 유전자를 전달하는 특성이 있으므로 in vivo 치료가 가능한 장점이 있다. 본 발명에서 제공하는 벡터는 바이러스의 복제에 필요한 시스-엘리먼트는 갖고있으나 복제에 필요한 바이러스 단백질의 ORF(open reading frame)가 결손되어 이를 발현할 수 없으므로 복제 가능한 B형 간염 바이러스를 생산할 가능성은 없다. 하지만, 복제에 필수적인 코아 단백질 및 폴리머라제가 제공되면 야생형과 마찬가지로 유전자 복제가 일어나므로 재조합 바이러스의 생산이 가능하다. 본 발명에 의하여 생산된 이중 유전자가 삽입된 재조합 바이러스는 in vivo 혹은 ex vivo 유전자 치료 프로토콜에 의해 환자의 간세포에 치료용 유전자를 전달할 수 있다.

【대표도】

도 8

【색인어】

B형 간염 바이러스, 재조합 플라스미드 벡터, 유전자 치료

【명세서】**【발명의 명칭】**

유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터{Hepatitis B virus vectors for gene therapy}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 B형 간염 바이러스의 프리게노믹 RNA를 도식화한 그림으로, 다음의 cis-element가 표시되어 있다: DR1 (direct repeat 1), DR2 (direct repeat 2), epsilon (encapsidation signal), r (repeat) element, PRE (posttranscriptional RNA processing element). 또한, 네 개의 ORF를 화살표 박스 그림으로 표시하고 있다: C (core) ORF, P (polymerase) ORF, S (surface antigen), 및 X ORF.

도 2는 B형 간염 바이러스의 감염주기를 나타낸 그림.

도 3은 바이러스의 폴리머라제가 프리게노믹 RNA를 주형으로 하여 역전사 과정을 통해 B형 간염 바이러스의 유전자 복제과정을 도식화한 그림.

도 4는 이중 유전자(GFP)가 삽입된 HBV 재조합 벡터의 세포 내에서의 작용을 요약한 그림으로 HBV 재조합 바이러스의 복제에 필요한 바이러스 단백질이 제공되는 packaging cell line에 트랜스펙션시켜 세포내 핵에서 CCC (covalently closed circular) 형태의 DNA로 복구되어 야생형과 마찬가지로 이중유전자를 가진 HBV 재조합 벡터에서의 이중유전자 발현과정을 도식화한 그림이다. Packaging cell line은 헬퍼 플라스미드로 대체할 수 있다.

도 5a는 R015 플라스미드(B형 간염 바이러스의 프리게노믹 RNA를 발현하는 플라스미드)를 제조하기 위한 도식도.

도 5b는 R015 플라스미드(B형 간염 바이러스의 프리게노믹 RNA를 발현하는 플라스미드)의 그림.

도 6은 B형 간염 바이러스의 유전자 중 시스-엘리먼트를 규명하기 위하여 제작한 결손 변이체의 결손 위치 요약한 그림으로, 결손부위를 굵은 선으로 표시. 왼쪽아래의 삽입된 그림은 DR2, DR1부위를 확대한 도면.

도 7은 B형 간염 바이러스 결손 변이체의 복제 여부를 HBV 프루브(probe)로 써던 블롯한 결과이며, 여기서 RC(relaxed circular DNA), DL(double-strand linear DNA), SS(single-stranded DNA)는 각각 HBV 유전자 복제의 중간체.

도 8은 원형(prototype)의 HBV 재조합 벡터의 지도로 B형 간염 바이러스의 복제에 필요한 새로운 시스-엘리먼트(알파와 베타)와 이중 유전자 삽입 가능 부위와 삽입가능 유전자 크기를 도식화한 것.

도 9는 이중 유전자인 녹색형광단백질(GFP; green fluorescent protein)가 삽입된 HBV 재조합 벡터 (R711 플라스미드)를 제조하기 위한 과정을 나타낸 도식도.

도 10은 시스-엘리먼트를 포함한 이중 유전자로 녹색형광단백질 (GFP; green fluorescent protein)가 삽입된 HBV 재조합 벡터(R711 플라스미드와 R712 플라스미드)의 도식도. R711 플라스미드는 야생형보다 약 0.6 K bp 작은 유전자를 갖는 재조합 HBV를 생산하게되며, R712 플라스미드는 야생형과 같은 크기의 유전자를 갖는 재조합 HBV를 생산하게된다.

도 11a는 이중 유전자로 녹색형광단백질(GFP)가 삽입된 HBV 재조합 벡터 R711(pCMV-HBV/GFP)의 복제 여부를 HBV 프루브로 확인한 써던 블롯 결과이며, 여기서 RC(relaxed circular DNA), DL(double-strand linear DNA), SS(single-stranded DNA)는 각각 HBV 유전자 복제의 중간체.

도 11b는 녹색형광단백질(GFP)이 삽입된 HBV 재조합 벡터 R711(pCMV-HBV/GFP)의 복제 여부를 GFP 프루브로 확인한 써던 블롯 결과이며, 여기서 RC(relaxed circular DNA), DL(double-strand linear DNA), SS(single-stranded DNA)는 각각 HBV 유전자 복제의 중간체.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<14> 본 발명은 유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 벡터에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 간세포에만 특이적으로 적중하여 in vivo 또는 ex vivo 유전자 치료로 사용할 수 있는 재조합 B형 간염 바이러스 벡터에 관한 것이다.

<15> 일반적으로 유전자 치료는 세포내의 유전자 발현의 이상으로 인한 많은 질환을 근본적으로 치유할 수 있어서 차세대 치료요법으로 인식되고 있다 (Anderson, W. F., Science 256:808-813,1992). 유전자 치료법은 아직 상업화되지 않았지만 게놈프로젝트의 완성으로 그 중요성이 더욱 부각되어 많은 바이오텍 회사와 대학병원에서 관심을 갖고 연구 개발이 진행되고 있다 (Mulligan, R. C., Science 260: 926-932,1993). 현재 유전자 치료는 크게 레트로바이러스 또는 아데노바이러스 등의 바이러스를 이용한 바이

러스벡터나 리포솜 또는 naked DNA등을 이용한 비 바이러스성 벡터 (nonviral vector)로 분류할 수 있다 (Friedmann, T. ed., *The Development of Human Gene Therapy*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1999). 이중 유전자 (heterologous gene)를 치료용 목적으로 이용하는데 있어서 중요한 목표는 목적하는 세포에 특이적으로 적중하는 것과 치료효과의 지속성이다. 그러나 세포 특이성의 결핍과 비효율적인 유전자 전달은 유전자 치료의 주요 개선점으로 대두되어 왔다. 뿐만 아니라 증상이 완화되거나 완치될 때까지 치료용 유전자 산물의 효과가 지속될 수 있게 하는 것도 중요한 문제이고, 대부분의 벡터가 세포에서 소멸 및 분해되는 지속성의 부족도 문제가 되어 그 효과를 더욱 낮게 하는 문제점이 있었다 (Crystal et al., *Science* 270:404-410, 1995).

- <16> 현재 주로 사용되고 있는 유전자 전달시스템은 유전자의 효율적인 전달을 위하여 바이러스에서 유래한 벡터들을 주로 사용한다. 특히, 레트로바이러스, 아데노바이러스 또는 아데노부속바이러스(adeno-associated viruses; AAV)등이 주로 사용된다 (Friedmann, T. ed., *The Development of Human Gene Therapy*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1999). 이들은 병원성이 없으며 바이러스 증식으로 인한 위험을 방지하기 위하여 복제능 (replication defective)이 없게 고안된 바이러스 벡터이다. 그러나 이들 바이러스 유래 벡터는 대상세포에 효율적으로 유전자를 전달하여 발현하기에는 이상적이지 못한 단점이 있다. 우선, 레트로바이러스는 대상세포의 게놈에 통합 (integration)되어 지속적으로 발현하는

장점이 있지만, 낮은 타이터 (titer)와 단지 분열하는 세포 (dividing cells)의 계층에만 통합하는 제한성으로 인하여 in vivo 치료에는 사용되기 어렵다. 반면, 아데노바이러스는 매우 높은 타이터 (titer)와 효율적인 유전자 전달능력 그리고 분열하지 않는 세포 (nondividing cells)에도 유전자를 전달하는 장점이 있다. 그러나 발현이 지속적이지 못하고 숙주에 면역반응을 유발하는 문제점이 있다. 더군다나, 치료효과를 유도하기 위하여 필수적으로 수반되는 반복적인 투여는 극심한 면역반응을 유발하는 부작용이 있다. 이러한 문제점 때문에 레트로바이러스와 아데노바이러스벡터는 임상적으로 사용되기에는 많은 개선이 필요하다. 또한, 현재 임상연구에서 가장 많이 사용되는 레트로바이러스와 아데노바이러스 벡터는 세포특이성이 없어 치료대상조직 뿐 아니라 기타 조직에도 감염되므로 in vivo therapy에는 부작용이 수반되는 문제가 있다.

<17> 상기의 바이러스벡터로는 조직특이성, 간 세포특이성 등등이 없으므로, 간 질환에는 in vivo 프로토콜은 부작용 등으로 제한되며 주로 ex vivo 프로토콜이 사용된다. ex vivo 프로토콜에 의한 간 적중 치료는 외과적인 적출 수술이 필수이므로 재조합 바이러스 벡터를 처리하여 만든 변형된 간세포(치료능력을 가진 간세포)를 환자의 간, 비장으로 형질도입 (transduction)이 불가피하게 된다. 하지만, 이러한 적출된 간세포를 실험실내 배양하기에는 많은 어려움과 복잡함, 그리고 막대한 비용을 필요로 하게된다.

<18> 바람직하게는 간적중 유전자치료벡터는 간세포에만 특이적으로 전달되어야 할 것이다. HBV와 같이 간향성 (hepatotropic) 바이러스에서 유래된 유전자치료백

터는 혈관 내 주사 또는 야생형 바이러스가 이용하는 간세포의 수용체를 이용하여 환자 내로 주입할 수 있다. HBV에서 유래한 간 적중 치료용 벡터의 개발에는 HBV 복제기전에 필수적인 시스-엘리먼트에 대한 정보가 선행되어야 하며, 시스-엘리먼트에 대한 완전한 규명 없이는 벡터로의 이용은 매우 제한적이다.

<19> HBV는 헤파드나바이러스과 (hepadnaviridae)에 속하며 숙주 특이성과 조직 특이성을 가진 작은 DNA 바이러스이다. 헤파드나바이러스는 인간(HBV), 북미산 우드척 (woodchuck; WHV), 북미산 얼룩다람쥐 (GSHV)같은 포유동물과 북경오리 (DHBV), 회색 해오라기(HHBV)같은 조류에서도 발견되고 있다 (Ganem, D., 'Hepadnaviridae and Their Replication,' in *Fundamental Virology*, 3rd edition, Fields et al., Lippincott-Raven Press, Philadelphia, 1996).

<20> 유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 벡터의 개발에 있어서 어려웠던 문제점은 바이러스의 복제기전에 필수적인 시스-엘리먼트에 대한 정확한 정보를 알지 못했던 점이다. 그러므로, HBV 게놈 전체에 걸친 시스-엘리먼트에 대한 정보가 유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 벡터의 개발에 있어서 꼭 선행되어야 할 부분일 것이다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<21> 본 발명은 상기한 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 벡터를 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<22> 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 HBV 게놈 복제에 필수적인 새로운 두 가지의 시스-엘리먼트인 서열목록 1에 기재된 알파-엘리먼트 (nt. 2818-3052) 및 서열목록

록 2에 기재된 베타(β)-엘리먼트 (nt. 1607-1804)서열을 포함하는 원형 (prototype)의 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터를 제공한다.

<23> 본 발명의 벡터는 5' 쪽에서부터 3' 쪽까지의 사이토메갈로 바이러스의 초기프로모터 (immediate early promoter), DR1 엘리먼트, 엡실론 엘리먼트 (epsilon, nt. 1849-1909), 제 1항의 알파-엘리먼트 (nt. 2818-3052), DR2 엘리먼트, 제 1항의 베타-엘리먼트 (nt. 1607-1804), DR1 엘리먼트를 포함하는 서열목록 3에 기재된 원형 (prototype)의 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터인 것이 바람직하다.

<24> 서열목록 3에서 사이토메갈로 바이러스의 초기프로모터 (immediate early promoter)는 염기서열 7408에서 7999이며, DR1 엘리먼트는 7에서 17, 엡실론 엘리먼트 (epsilon, nt. 1849-1909)는 30에서 90, 제 1항의 알파-엘리먼트 (nt. 2818-3052)는 998에서 1233이며, DR2 엘리먼트는 2955에서 2965이며, 제 1항의 베타-엘리먼트 (nt. 1607-1804)는 2970에서 3167이고, DR1 엘리먼트는 3189에서 3199이며, 91에서 997까지와 1233에서 2954까지에 각각 약 0.9kb와 약 1.7kb의 외래 유전자가 삽입된 수 있는 부위가 존재한다.

<25> 즉, 본 발명의 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터는 상기의 엡실론(nt. 1849-1909)과 상기의 알파-엘리먼트(nt. 2818-3052) 사이와 상기의 알파-엘리먼트(nt. 2818-3052)와 상기의 DR2 (nt. 1592-1602) 사이에 외래 유전자 삽입 부위가 존재한다(도 8참조).

<26> 또, 본 발명의 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터에 있어서, 상기의 벡터는 HBV 유전자 중 내부바이러스 프로모터를 사용하며, 내부바이러스 프로모터 중에서 코아 프로모터와 프리 S2/S 프로모터를 각각 선택하여 사용하는 것이 바람직하다.

- <27> 또한, 본 발명의 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터는 야생형 3.2 K bp HBV 게놈의 크기를 증가시키지 않고 엡실론 엘리먼트와 알파 엘리먼트 사이에 0.90 K bp까지 삽입할 수 있고, 알파 엘리먼트와 DR2 엘리먼트 사이에 1.7 K bp까지 삽입할 수 있는 벡터이다.
- <28> 또한, 본 발명의 벡터에 있어서, 상기의 벡터는 복제에 필수적인 코아 단백질 혹은 폴리머라제 유전자가 결손된 복제불능 (replication- defective)인 벡터이다.
- <29> 본 발명의 벡터는 적어도 한 개의 이종유전자 (heterologous gene)를 발현할 수 있는 이종 염기서열을 포함하는 벡터이다.
- <30> 또 본 발명은 B형 간염바이러스의 캡시드화에 필수적인 '엡실론' 엘리먼트가 결손되어 복제할 수 없지만 B형 간염바이러스의 단백질을 발현하여, 재조합 HBV 벡터에 바이러스 유전자 복제에 필요한 단백질 (trans-acting factors)을 발현하는 헬퍼 플라스미드 (helper plasmid)를 제공한다.
- <31> 또한, 본 발명은 상기의 재조합 HBV 벡터와 상기의 헬퍼 플라스미드를 간 세포주에 함께 트랜스팩션하여 재조합 HBV 입자를 만들 수 있는 방법을 제공한다.
- <32> 상기의 재조합 HBV 벡터는 바이러스 유전자 복제에 필수적인 시스-엘리먼트를 포함하며, 적어도 한 개의 유전자 치료용 이종유전자를 발현할 수 있으며, 또한 바이러스 유전자 복제에 필요한 바이러스 유전자 중 적어도 한가지를 발현할 수 없으며, 상기의 헬퍼 플라스미드(helper plasmid or packaging plasmid)는 바이러스 유전자 복제에 필요한 단백질 (trans-acting factors) 중 적어도 한가지를 발현할 수 없는 재조합 HBV 벡터에 이 결핍된 단백질을 제공하여 재조합 HBV 벡터를 보완 (complementation) 하여 감염

성있는 바이러스를 생산할 수 있어야 하고, 상기의 간 세포주는 복제에 필요한 단백질 (trans-acting factors) 이 제공되면 재조합 HBV 벡터가 복제할 수 있는 간 세포주이다.

<33> 본 발명에서 간세포는 인간의 간세포, 조류의 간세포, 설치류의 간세포의 집단으로부터 선택된 간세포인 것이 바람직하다.

<34> 또한, 본 발명은 상기의 재조합 HBV 입자를 혈관 내 또는 간 조직 내 투여 방법으로 표적세포(target cell)에 감염시키는 방법을 제공한다.

<35> 표적세포에 감염시키는 방법에 있어서, 위에 언급한 삽입할 수 있는 외부 유전자는 다양한 유전자에 대한 안티센스(anti-sense) 유전자와 라이보자임 (ribozyme)을 포함하며, 특히 B형 간염바이러스와 C형 간염바이러스의 안티센스(anti-sense)유전자와 라이보자임 (ribozyme)을 만드는 유전자를 포함한다. 또한, 다양한 암 억제 (tumor suppressor) 유전자, 성장 인자 (growth factor), 호르몬 (hormones), 사이토카인 (cytokine), 세포막 수용체 (cellular receptors), 혈액 응고 인자로 구성된 이중 유전자를 포함한다.

<36> 또, 재조합 HBV 입자를 표적세포 (target cell)에 감염시키는 방법으로 다음을 포함한다. HBV에 만성 감염된 환자의 간 조직내로 직접 재조합 HBV 벡터 DNA의 주입방법을 포함하며, 위에 언급한 삽입할 수 있는 외부 유전자는 다양한 유전자에 대한 안티센스(anti-sense) 유전자와 라이보자임 (ribozyme)을 포함하며, 특히 B형 간염바이러스와 C형 간염바이러스의 안티센스(anti-sense)유전자와 라이보자임 (ribozyme)을 만드는 유전자를 포함한다. 또한, 다양한 암 억제 (tumor suppressor) 유전자, 성장 인자

(growth factor), 호르몬 (hormones), 사이토카인 (cytokine), 세포막 수용체 (cellular receptors), 혈액 응고 인자로 구성된 이중 유전자를 포함한다.

<37> 본 발명의 이해를 돕기 위하여 다음의 용어를 아래와 같이 정의한다.

<38> '엘리먼트 (element)'는 DNA 혹은 RNA의 염기서열로서 특정한 기능을 갖는 염기서열을 말한다. '시스-엘리먼트 (cis-acting element)'는 동일 DNA 혹은 RNA 분자내에서 조절기능을 갖고 작용하는 염기서열을 말한다. '캡시드화 (encapsidation)'는 '팩키징 (packaging)'과 같은 의미로 사용되었으며, 코아 입자내로 바이러스 유전자 (DNA 혹은 RNA)가 들어가는 과정을 말한다. '이종유전자 (heterologous sequence or gene)'은 HBV 유전자가 아닌 유전자를 말하며, '외부유전자 (foreign gene)'와 동일한 의미로 사용되었다.

<39> '벡터'는 DNA 절편을 포함하여 다른 세포로 운반하는 기능이 있는 핵산염기서열을 말하며, 원형의 벡터는 이중 유전자를 삽입할 수 있어 일반적으로 사용할 수 있는 벡터를 말한다.

<40> 본 발명에서 HBV의 염기서열은 두 가지로 표시되어있다. 우선, 명세서의 본문에서는 특별히 지적하지 않은 경우에는 모두 Galibert의 방법에 따라 HBV 염기서열을 표시하였다 (Galibert et al, Nature 28: 646-650, 1979). 이 경우 nt.----로 표시하였다. 한편, 첨부한 염기서열 목록은 프리게노믹 RNA의 개시부위인 nt. 1820을 1로 하여 각각 플라스미드의 염기서열을 표시하였다.

<41> 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

<42> I. B형 간염 바이러스(HBV)

<43> B형 간염 바이러스(Hepatitis B virus, HBV)는 헤파드나바이러스에 속하며 급성 간염 뿐 아니라, 만성 간염을 일으키는 임상적으로 매우 중요한 바이러스이다. 우드척 간염 바이러스 (WHV), 얼룩 다람쥐 간염 바이러스 (GSHV), 오리 간염 바이러스 (DHBV) 등이 헤파드나바이러스과에 속한다 (Ganem, D., 'Hepadnaviridae and Their Replication,' in *Fundamental Virology*, 3rd edition, Fields et al., Lippincott-Raven Press, Philadelphia, 1996). HBV는 DNA 바이러스이지만 프리게노믹 RNA를 주형으로 하여 HBV DNA 중합효소가 가지고 있는 역전사활성 (reverse transcriptase activity)을 통하여 DNA 유전자로 복제하는 매우 특이한 복제기전을 가지고 있는 바이러스이다. HBV는 약 3.2 k bp의 플러스-DNA 가닥에 틸(gap)이 존재하는 원형의 DNA 유전자를 갖고 있으며, 코아 (C), 폴리머라제 (P), 표면항원 (S), 그리고 X 단백질의 네 개의 바이러스 단백질을 갖고있다.

<44> II. 헤파드나바이러스(Hepadnavirus)의 감염주기

<45> 헤파드나바이러스의 감염주기는 도면 2에 표시되어있다. 헤파드나바이러스는 수용체(receptor-mediated endocytosis)를 통해 간세포에 침입한다고 알려져 있다. 간세포로 들어온 후, 틸 (gap)이 존재하는 HBV 게놈은 전사(transcription)의 주형(template)이 되는 covalently closed circular DNA (CCC DNA)로 전환된다. 네 개의 바이러스의 전사체가 합성된 후 세포질로 이동된다. 3.5 Kbp의 프리게노믹 RNA는 코아와 폴리머라제의 mRNA로서 작용할 뿐 아니라 바이러스 유전자 복제의 주형으로도 작용한다.

<46> III. 역전사 (reverse transcription) 과정

- <47> HBV는 레트로바이러스와는 다른 역전사 과정을 가진다 (Nassal et al., J. Virol. 70:2764-2773, 1996). HBV는 바이러스 복제를 위해 코아 단백질(core protein)과 프리게노믹 RNA를 인식하는 폴리머라제가 함께 코아 입자로 캡시드화된 후 이 코아 입자 안에서 폴리머라제에 의한 유전자 복제가 일어난다. 폴리머라제 단백질과 프리게노믹 RNA의 결합이 유전자 복제에 필수적인 코아 입자 형성에 중요하다. 프리게노믹 RNA의 5' 쪽 말단 부위에 존재하는 '엡실론'이라고 불리는 약 85 염기쌍 (base pairs)의 특이한 2차구조의 염기서열이 캡시드화 단계에서 시스-엘리먼트로 작용한다 (Junker-Niepmann et al., EMBO J. 9:3389-3396, 1990; Hirsch et al., J. Virol. 65:3309-3316, 1991). 이 엡실론은 스템-루프 구조(stem-loop structure)를 이루며, 헤파드나바이러스에 속하는 모든 바이러스에 매우 높게 보존되어 있다.
- <48> HBV 폴리머라제의 역전사 과정은 HBV의 독특한 게놈 구조만큼 매우 복잡하다 (도면 3; Nassal et al., J. Viral Hepatitis 3: 217-226, 1996). 야생형의 완전한 이중-가닥 DNA 게놈을 형성하기 위해서는 아래와 같은 주형 스위칭 과정(template switching)이 필요하다 (도면 3). 첫째, 코아 입자 안에 캡시드화된 프리게노믹 RNA를 주형으로 하여 HBV의 DNA 폴리머라제가 역전사 과정으로 마이너스-가닥 DNA를 합성한다. 이 마이너스-가닥 DNA합성의 프라이머와 폴리머라제로 동시에 HBV의 DNA 폴리머라제가 이용된다. (Wang et al., J. Virol. 67:6507-6512, 1993) 즉, 단백질-프라이밍 (protein-priming)에 의하여 마이너스-가닥 DNA 합성이 개시된다. 이 프라이밍 과정에서 5'에 존재하는 엡실론(ϵ)이 HBV 마이너스-가닥 DNA합성의 개시부위 (initiation

site)로 작용한다 (Pollack et al., J. Virol. 68: 5579-5587, 1994). 다음, 이 마이너스-가닥 DNA는 엡실론과 DR1(direct repeat) 사이의 4 염기쌍의 상동성 (homology)을 이용하여 5'에서 3' DR1로 이동한다 (Nassal et al., J. Virol. 70:2764-2773, 1996). 이 과정을 마이너스-가닥 이동 (minus-strand translocation)이라고 부른다. 마이너스-가닥 DNA가 합성되면서 HBV 폴리머라제가 갖고있는 RNase H 활성에 의해 프리게노믹 RNA는 5'-말단 쪽의 18 뉴클레오타이드 RNA만을 제외하고는 분해된다 (Loeb et al., EMBO J. 10:3533-3540, 1991). 다음, 5'-말단 캡 RNA가 3' DR2로 전달된 후 RNA 프라이머로 작용하여 플러스-가닥 DNA를 합성한다. 이어서 DR2 부위로 주형 스위칭 (template switching)을 하여 플러스-가닥 DNA 합성을 시작하고, 플러스-가닥 DNA는 DR2로 이동 (translocation)되는 원형화 (circularization) 단계를 거쳐 원형의 게놈을 합성한다 (Loeb et al., J. Virol. 71:152-160, 1997). 이 플러스-가닥 DNA의 합성이 완결되기 전에 HBV DNA는 바이러스 표면항원입자에 쌓여 세포 밖으로 나간다. 결국, HBV는 원형의 틸이 존재하는 이중-가닥 게놈을 갖게된다.

<49> IV. HBV 게놈 복제에 필수적인 시스-엘리먼트

<50> 위에서 기술되어있듯이, HBV는 세 번의 주형스위칭 (template switching)을 통하여 선형의 프리게노믹 RNA를 원형의 이중가닥 DNA로 복제한다. 지난 20년간, 분자생물학적인 기법으로 바이러스 DNA 복제에 중요한 역할을 하는 엘리먼트를 밝혀냈다 (Nassal et al., J. Viral Hepatitis 3: 217-226, 1996). 문헌에 보고된 시스-엘리먼트를 나열해보면, 캡시드화 신호로 이용되는 5'쪽 엡실론 엘리먼트가 알려졌고 (Junker-Niepmann et al., EMBO J. 9:3389-3396, 1990; Hirsch et al., J. Virol. 65:3309-3316, 1991), 바이러

스 복제 단계 중에 프라이머 이동(translocation) 과정에서 이용되는 DR1과 DR2 (Condreay et al., Virology 188:208-216,1992), 원형화(circularization) 단계에서 이용되는 r(repeat)가 작용한다 (Loeb et al., J. Virol. 71:152-160,1997). 그리고, posttranscriptional RNA processing element (PRE) 등이 있다 (Huang et al., Mol. Cell. Biol. 15:3864-3869,1995). 이러한 시스-엘리먼트는 대부분 HBV 프리게놈의 양쪽에 존재한다 (도면 1과 도면 8). 한편, Hepadnavirus중에서 DHBV (Duck hepatitis B virus)의 경우, 3E, M, 5E라고 명명된 세 개의 엘리먼트가 유전자 복제에 필요함이 보고되었으며, 플러스-가닥 DNA를 합성시 주형 스위칭(template swiching)에 필요하다 (Havert et al., J. Virol. 71: 5336-5344,1997). DHBV와는 달리, HBV는 아직 복제에 필요한 시스-엘리먼트가 규명되지 않았다. 이러한 이유로, HBV 게놈은 유전자 치료용 벡터로 이용되지 못하고 있다. 유전자 치료 벡터는 복제에 필요한 시스-엘리먼트를 반드시 포함하고 있어야 한다. 본 발명에서는 HBV 유전자 복제에 필요한 시스-엘리먼트를 규명한 후 이 정보를 기반으로 재조합 HBV벡터를 설계하였다.

<51> V. 원형의 HBV벡터의 설계

<52> HBV 게놈 복제에 필요한 모든 시스-엘리먼트를 규명하고, 복제에 필수적인 바이러스 단백질 (trans-acting factors)가 제공된다면 복제능 (replication competent)이 존재하는 이중 유전자를 가진 유전자 치료용 벡터로 개발될 수 있을 것이다. 간단히 말하면, HBV 벡터는 바이러스 단백질은 코딩(coding)할 능력이 없으면서 바이러스 게놈 복제에 필요한 모든 시스-엘리먼트를 가지고 있는 것이다. 그럼에도 불구하고, 헬퍼(helper) 플라스미드나 팩키징 세포주(packaging cell line)를 통해 바이러스 단백질 (

예를 들자면, 코아 단백질, 폴리머라제 단백질, 표면 단백질)이 제공된다면 재조합 HBV 벡터는 복제 될 수 있다 (도면 4). 이중유전자의 삽입부위의 선정, 삽입된 이중유전자의 크기, 이중유전자의 발현을 위해 이용되는 프로모터 (promoter) 등이 성공적인 유전자 치료용 벡터 개발의 관건이 될 수 있다.

<53> 먼저, 본 발명에서는 2개의 시스-엘리먼트를 규명하였다. 하나는 알파 엘리먼트이고 다른 하나는 베타 엘리먼트이다 (도면 8). 본 발명의 방법을 구체화하기 위해, 본 발명에서는 2개의 삽입가능 부위를 선정하였다 (도면 8). 하나는 5' 엡실론과 알파 엘리먼트 사이이고 다른 하나는 알파 엘리먼트와 DR2 엘리먼트 사이이다. 이 두 개의 삽입부위는 바이러스 복제에 있어 결손가능부위 (dispensable region)이다. 하지만, 삽입부위의 선정을 지금의 것으로 한정짓진 않고 원형 (prototype) HBV 벡터의 5' 엡실론과 알파-엘리먼트 사이에 이중 유전자를 삽입도 가능할 것이다 (도면 8). 삽입할 수 있는 이중 유전자의 크기는 야생형의 게놈 크기를 고정시킨다고 생각하였을 때, 각각 0.90 K bp와 1.7 Kbp까지 가능하다 (도면 8). 최근에, 야생형보다 약 0.2 K bp정도 큰 크기의 프리게노믹 RNA까지 마이너스-가닥 DNA 합성이 가능함이 보고되었다 (Ho et al., J. Virol. 74:9010-9018, 2000). 따라서, 본 발명에서는 상기의 두 군데의 삽입위치에 각각 1.1 K bp, 1.9 K bp 까지 크기의 절편의 삽입하여도 복제할 가능성을 배제하지 않는다. 다행히, 삽입부위보다 위쪽에 존재하는 두개의 내재된 바이러스 프로모터(즉, 코아 프로모터와 프리-S2/S 프로모터)를 이용하여 이중유전자가 전사되도록 설계하였다. 더 나아가서, 본 발명의 재조합 HBV 벡터는 바이시스트로닉 (bicistronic) 발현벡터로 고안되어 있으므로, 두개의 삽입부위에 삽입된 이중 유전자가 동시에 발현 가능하다.

<54> 헤파드나바이러스의 간향성 (liver tropism)은 간 질환의 유전자 치료에 있어 HBV

를 이용하려는 가장 중요한 특성이다. 본 발명에서 제공하는 간 적중 HBV백터는 간염, 간 경변, 간암 등의 간 질환 뿐 아니라, 가족성 고지혈증 (familial hypercholesterolemia), 혈액응고인자 VIII, IV가 결핍되어 발생하는 혈우병 (hemophilia)등의 간세포에 유전자 발현이 결핍되어 발생하는 대사성 유전병 치료에도 활용될 수 있다. 또한, 간 적중 HBV백터는 만성 간염환자의 치료에도 매우 유용할 것이다. B형 간염 바이러스에 이미 감염된 만성 감염자는 바이러스의 복제에 필요한 코아 단백질과 폴리머라제가 간 세포내에 항상 발현되고있다. 따라서, 본 발명에서 제공하는 HBV백터에 치료용 유전자가 삽입된 재조합 DNA를 만성감염자의 간세포에 직접 또는 혈액 순환을 통해 주입하면 재조합 바이러스가 HBV 만성감염자의 간세포에서는 복제가 지속적으로 가능할 것이다. 이는 만성 간염 치료에 매우 효율적일 것이다.

<55> 본 발명에서는 HBV의 복제에 필수적인 B형 간염 바이러스 게놈의 시스-엘리먼트 (α -element, β -element)에 대한 정보를 제공하고 있으며, 알파 엘리먼트, 베타 엘리먼트의 뉴클레오타이드 서열을 제공하고 있다.

<56> 본 발명에서는 재조합 HBV 게놈을 이용하고 있지만, 본 발명이 HBV에 국한되진 않을 것이다. 헤파드나 바이러스에 속하는 우드척 간염 바이러스(WHV), 얼룩 다람쥐 간염 바이러스(GSHV), 오리 간염 바이러스(DHBV) 등도 서로의 게놈도 유사하므로 본 발명이 다른 헤파드나 바이러스의 유전자 치료용 벡터개발에도 이용될 수 있을 것이다.

<57> 본 발명을 구체화하기 위해 바이러스 유전자 복제에 필수적인 시스-엘리먼트를 완전히 규명한 후 이들 시스-엘리먼트를 보존한 원형(prototype)의 HBV 벡터를 설계하였다. 하지만, 본 발명에서 제시하는 두개의 새로운 시스-엘리먼트(알파 엘

리먼트, 베타 엘리먼트)의 위치를 한정짓지는 않는다. 최대 팩키징 사이즈 (maximal packaging size)이내에서는 야생형 프리게노믹 RNA의 크기인 3.5 kb보다 큰 사이즈의 프리게노믹 RNA 삽입도 가능할 수 있으며, 새로운 시스-엘리먼트는 벡터의 기능에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 벡터내의 시스-엘리먼트의 상대적인 위치 변경도 가능 할 수 있다.

<58> 본 발명에서 제공하는 재조합 HBV 게놈의 캡사드화 (encapsidation)를 위해 다음과 같은 과정이 선행되어야 한다. 첫째, 재조합 HBV 벡터는 최소한 한 개 이상의 이중 유전자를 발현한다. 둘째, 헬퍼 플라스미드는 바이러스의 캡시드화와 게놈 복제에 필수적인 코아 단백질, 폴리머라제, 및 표면항원을 트랜스 (in trans)로 제공한다. 즉, 헬퍼 플라스미드와 재조합 HBV 벡터는 간 세포 내에서 서로 상호 보완현상(complementation)으로 캡시드화되어 바이러스 입자(particle)를 형성 할 수 있다. 본 발명이 이용될 수 있는 간세포주주는 다음과 같은 HepG2세포, Huh7세포, Chang 간세포 등의 인간 간 세포주와 설치류 간 세포주를 포함하는 일련의 간 세포주가 사용될 수 있다.

<59> HBV의 유전자에 이중유전자를 삽입 혹은 치환하여 재조합 HBV의 가능성을 탐색한 연구가 몇가지 문헌에 보고된 바 있다 (Chiang et al., Virology 186:701-711,1992; Chaisomchit et al., Gene Therapy 4:1330-1340,1997; Protzer et al., Proc Natl Acad Sci USA 96:10818-10823,1999). 본 발명은 미국특허 제 5,981,274호와 는 몇가지 점에서 차별된다 (Tyrrell et al., US Patent 5,981,274, 1999; Chaisomchit et al., Gene Therapy 4:1330-1340,1997). 상기 특허는 이중유전자를

HBV 폴라머라제의 스페이서(spacer or tether) 도메인에 삽입시켰다. 무엇보다도 미국 특허 제 5,981,274호에서 사용한 외부유전자 삽입부위는 본 발명에서 규명한 알파-엘리먼트 부위에 해당한다. 즉, 이 알파부위는 HBV 유전자 복제에 필수적이므로 이 부위에 외부유전자의 삽입은 복제를 저해한다. 유전자를 발현하기에는 작은 크기(270 혹은 374 bp)의 절편을 삽입하였으며, 삽입 후 벡터의 복제가 약 50배 감소하였으므로 벡터로 불리기는 어렵다. 이러한 이유로 상기의 미국특허 제 5,981,274호는 유전자 치료용 벡터라고 구분될 수 없다.

<60> 한편, 대만의 Dr. Chang의 연구실에서 약 0.7 Kb 의 발광유전자 (luciferase)를 HBV 유전자의 두 곳에 치환하여 재조합 HBV 입자가 생산됨을 보고된 바 있다 (Chiang et al., Virology 186:701-711,1992). 또한, 최근에 DHBV와 HBV를 재조합 벡터로 사용한 첫 번째의 성공사례가 보고되었다 (Protzer et al., Proc Natl Acad Sci USA. 96:10818-10823,1999). 이 보고에서는 바이러스 유전자 복제에 필수적인 시스-엘리먼트에 대한 정보없이 녹색형광단백질(GFP) 혹은 인터페론유전자를 HBV 혹은 DHBV 유전자의 여러 곳에 삽입한 결과, 그 중 표면항원 ORF (즉, S ORF)에 이중 유전자를 치환하였을 때 바이러스가 생산됨을 관찰하였다. 본 발명에서 제공하는 HBV 벡터는 상기 보고와 몇 가지 면에서 차별되는 장점이 있다. 우선, 본 발명은 시스-엘리먼트를 완전히 규명하여 설계한 원형 (prototype)의 HBV 벡터를 제공한다. 즉, 표면항원 ORF를 포함하는 두 군데의 삽입부위를 제공할 뿐 아니라 삽입할 유전자의 최대크기의 한계를 각각 0.79 kb or 1.7 kb임을 구체적으로 제공한다. 즉, 일반적으로 이중유전자를 삽입하여 사용할 수 있는 본격적인 의미의 재조합 유전자 벡터이다.

<61> 본 발명에서 제공하는 HBV 벡터를 구축하기 위해 사용된 트랜스팩션 기술은 문헌과

이 분야의 전문가들이 많이 사용하는 실험재료와 실험방법을 이용하였다.

<62> 본 발명에서 제공하는 HBV 벡터를 만들기 위해 사용하는 접합 (ligation)기술과 제한 (restriction)기술은 문헌 (Sambrook et al., in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 3rd Ed., N. Y. 2001)에서 기술되어 있는 방법을 사용하였다.

<63> 본 발명에서는 다음과 같은 약어를 사용하였다: DR1 (direct repeat 1), DR2 (direct repeat 2), ϵ (epsilon), GFP (green fluorescence protein), M (molar), mM (millimolar), ml (milliliters), μ g (micrograms), mg (milligrams), K bp (kilo base pairs), PCR (polymerase chain reactin), PEG (polyethylene glycol).

<64> 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다.

<65> 단, 다음의 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 다음의 실시예가 본 발명을 한정하는 것은 아니다.

<66> 실시예 1 : 야생형 HBV발현 벡터(R015; pCMV-HBV/30)의 제조

<67> HBV 유전자 치료벡터를 설계하려면 HBV의 유전자 복제에 필수적인 염기서열부위 (시스-엘리먼트)의 완전한 규명이 선행되어야 한다. 이러한 복제에 필요한 염기서열부위를 규명하기 위하여 세포에 트랜스팩션하였을 때 HBV 유전자 복제능(replication competent)을 갖는 벡터를 제조하였다. 즉, 야생형 HBV를 생성하는 HBV 프리게노믹 RNA 발현 벡터를 제조하였다. 이중 프로모터에 의해 HBV 프리게노믹 (pregenomic) RNA와 동일한 구조 및 염기 서열의 mRNA가 전사되면 HBV의 복제 기작과 동일한 과정을 통해 바이러스 입자를 만들 수 있다는 것은 공지의 사실이다 (Nassal, et al., Cell

63:1357-1363,1990). 그러므로, HBV를 발현하는 플라스미드를 제조하기 위해 우선적으로 고려해야 할 사항은 바로 전사되는 mRNA가 HBV 프리게노믹 RNA와 동일하도록 만드는 것이다. 이후, 전사된 mRNA로부터 복제에 필요한 바이러스의 단백질이 만들어지고 바이러스 유전자의 복제 및 바이러스 입자가 생산된다. 특히 캡시론 (ϵ)이라는 캡시드화(encapsidation) 신호는 바이러스의 복제의 첫 단계에서 캡시드화에 필수적인 중요한 인자이다 (Junker-Niepmann et al., EMBO J. 9:3389-3396,1990; Hirsch et al., J. Virol. 65: 3309-3316,1991). 이 캡시론 신호는 프리게노믹 RNA의 5'-말단으로부터 약 30 뉴클레오타이드 (nucleotide) 떨어져 있다 (Jeong et al., J. Virol. 74:5502-5508,2000).

<68> 본 발명에서 사용한 염기서열 번호는 Galibert등(Galibert, et al., Nature 28: 646-650,1979)의 방법에 따라, HBV ayw 서브타입 (subtype)의 염기 서열을 HBV 내의 제한효소 *EcoR* I 위치를 1번으로 하여 3182번까지 표기한 것이다. 표시된 염기서열번호는 HBV의 것이며, 만약 다른 것의 염기서열번호를 사용시는 따로 표시해 주었다. 프리게노믹 RNA의 5'쪽 말단부위는 1820 서열번호로 표시하였으며, 전사시작 자리를 의미한다. R015 플라스미드의 염기서열은 서열목록3에 표시되어있다.

<69> 1-1. R402 플라스미드(pCMV-HBV/164)의 제조

<70> HBV 유전자는 HBV ayw subtype의 유전자를 갖는 pSV2A-Neo(HBV)2 플라스미드를 이용하였다 (Shih et al., Proc Natl Acad Sci USA. 86(16):6323-71989, 1989).

우선, HBV의 프리게노믹 RNA의 5'-말단과 3'-말단이 동일한 염기서열 및 구조(terminal redundancy)를 가지기 때문에 선상(linear)의 플라스미드 전사에서 이를 보전하기 프로 모터의 하부(downstream)에 게놈크기보다 큰 게놈을 삽입하였다. 그러므로, CMV 프로모 터로부터 숙주세포의 RNA 폴리머라제 (polymerase) II에 의해 전사가 일어나는 pcDNA1/Amp (Invitrogen, USA)의 클로닝 사이트에 있는 *EcoR* V와 *Xba* I의 제한효소 인식 부위 사이에 HBV 전체 유전자보다 172 뉴클레오타이드가 더 겹치는 길이의 HBV ayw 서브타입(subtype) 유전자를 *Fsp* I과 *Xba* I으로 잘라서 삽입하였다 (도면 5a참조). 이로써 만들어진 R402 플라스미드(pCMV-HBV/164)는 야생형 HBV와는 달리 5'-말단으로부터 엡실론 신호가 164 뉴클레오타이드 떨어져 있는 mRNA로 전사된다. 이는 야생형에 비하여 엡실론의 위치가 5'-말단으로부터 134 뉴클레오타이드가 더 멀리 떨어진 것이다 (Jeong et al., J. Virol. 74:5502-5508, 2000). 이러한 결과는 pcDNA1/Amp의 전사가 시작되는 지점이 삽입부위보다 상부(upstream)에 위치하기 때문이다.

<71> 1-2. 야생형 HBV 프리게노믹 RNA를 발현하는 R015 플라스미드(pCMV-HBV/30) 제조

<72> 야생형 HBV 프리게노믹 RNA와 같은 염기 서열 및 구조를 지닌 mRNA를 전사하도록 만들기 위해 실사에 1-1에서 만든 플라스마드의 5'-말단 염기를 제거하였다. 도면 5a에서와 같이 R402 플라스미드(pCMV-HBV/164)를 *Sac* I과 *BspE* I으로 자르고, 동일한 제한효소 인식 부위를 양끝에 보유한 HBV유전자 절편을 PCR(polymerase chain reaction)을 통해 증폭하였다 (Jeong et al., J. Virol. 74:5502-5508, 2000). 이때 인위적인 제한 효소 인식 부위를 삽입하고 R402 플라스미드의 전사 시작 부위에 HBV 프리게노믹 RNA 시작 부위가 정확하게 일치하도록 프라이머(HBV1820)를 제작하였다. 사용한 프라이머 염기 서열은 다음과 같다.

<73> HBV1820 ;

<74> 5-CCCGAGCTCTCTGGCTAACTAACTTTTTCACCTCTGCC-3

<75> *Sac* I HBV 염기 서열(nt 1820-1837)

<76> HBV2839-2822 ;

<77> 5-CCCAAGCTTCTATTGTTCCCAAGAATATGG-3

<78> 이들 프라이머와 R402 플라스미드를 주형(template)으로 하여 만들어진 PCR 산물을 다시 *Sac* I (nt 2894 of pcDNA1/amp)과 *BspE* I(nt. 2331)으로 잘라서 플라스미드 R402에 삽입하였다.

<79> 1-3. 헬퍼 플라스미드 R063 (pCMV- CPS) 플라스미드의 제조

<80> pcDNA3 (Invitrogen, USA)의 *EcoR* I, *Xho* I 인식부위에 R015 플라스미드를 주형으로 하여 만든 PCR 생성물(nt. 1903-to-2454)을 삽입하였다. 자세히 설명하면, 정방향 프라이머(forward primer)의 5' 쪽 말단 부위에 *EcoR* I 인식부위를 만들고 역방향 프라이머(reverse primer)의 5' 쪽 말단 부위에 *Xho* I 인식부위를 만든 PCR 생성물인 0.5 K bp의 *EcoR* I, *Xho* I 절편을 pcDNA3 플라스미드의 *EcoR* I, *Xho* I 인식부위에 삽입하여 R062 플라스미드를 만들었다. 그 다음, R015 플라스미드의 *BspE* I (nt. 2331), *Apa* I 사이의 약 2.6 K bp의 절편을 R062 플라스미드의 *BspE* I, *Apa* I 절편과 치환하여 R063 플라스미드를 만들었다. R063 플라스미드는 코아, 폴리머라제, 표면항원을 발현하는 헬퍼 플라스미드로 사용되었다.

<81> Forward primer: 5'-CATGGAATTCATGGACATCGACCCT-3'

<82> (*EcoR* I site underlined)

<83> Reverse primer: 5'-CCGCTCGAGCTAACATTGAGATTCCCGAGA-3'

<84> (Xho I site underlined)

<85> 실시예 2 : R015 플라스미드(pCMV-HBV/30)에서 전사되는 프리게노믹 RNA의 복제능

<86> 2-1. 간암세포주의 세포성장과 트랜스팩션

<87> 간암 세포주인 Huh7 세포를 10% FBS(fetal bovine serum)과 10mg/ml gentamicin 을 넣은 DMEM (Gibco-BRL) 배지에 3일마다 분주하여 세포를 키웠다. 트랜스팩션하기 하루 전에 Huh7 세포를 75 %로 60mm 플레이트에 배양시켜 세포를 준비한다. 먼저 인산완충용액 (phosphate buffered saline)으로 세포를 두 번 씻고 새 배양액으로 갈아준다음, 상기 플라스미드 10 μ g을 0.25 M CaCl_2 가 포함된 250 ml의 물에 섞은 다음, 동량의 2X HEPES 완충용액 [280 mM NaCl, 50 mM HEPES acid, 1.5 mM Na_2HPO_4 (pH 7.1)] 에 흔들면서 한 방울 씩 떨어뜨려 혼합물을 만든다. 이후 이 혼합물을 상온에서 30분간 반응시켜 하얀 침전물이 생기도록 한 다음 플레이트에 골고루 뿌려준다. 트랜스팩션 16시간 후 새로운 배양액 [DMEM, 10% FBS, 10 mg/ml gentamycin]으로 갈아주고, 3일 후 바이러스 코아 입자를 추출하였다.

<88> 2-2. 코아입자로부터 HBV DNA 추출 및 써던 블롯을 통한 HBV replication-intermediate DNA의 조사

<89> 트랜스팩션 3일 후, PEG 침전법으로 세포내 코아입자를 추출하여 HBV의 DNA를 준비하였다 (Staprans et al., J. Virol. 65:1255-62,1991). 자세히 설명하면, 먼저 인산완

충용액 (phosphate buffered saline)으로 세포를 두 번 씻고 세포용액 완충용액 [10 mM Tris (pH 7.5), 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 8 % sucrose, 0.25 % Nonidet P-40]로 세포를 플레이트로부터 떼어낸다. 남아있는 트랜스팩션한 플라스미드를 제거하기 위해 6 mM MgCl₂와 DNase I (50 μ g/ml) 처리를 37 °C 30분간 처리한 후, 4 X PNE [26 % PEG, 1.4 M NaCl, 40 mM EDTA]로 코아입자를 침전시키고 원심분리를 하여 코아 입자만을 분리해 내었다. 수득한 코아 입자 단백질을 분해하기 위해 프로네이즈(pronase, Sigma, USA)로 37 °C에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후 페놀과 클로로포름(1:1)으로 단백질을 제거하고 에탄올로 코아 입자를 침전시킨 후, TE [10 mM Tris(pH 8.0), 1 mM EDTA]로 DNA를 추출하였다.

<90> 추출된 바이러스 DNA를 1.25 % 아가로스젤을 통해 전기 영동하고, 문헌(*Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, F. et al., eds., Wiley and Sons, New York, 1995)에서 기술된 써던 블롯 방법으로 분석하였다.

<91> 실시예 3 : R015 플라스미드(pCMV-HBV/30)의 결손 변이체의 제조

<92> 일반적인 유전자 재조합 기술을 이용하여 다음과 같은 결손 변이체를 만들었다.

<93> 3-1. R060(pCMV- ayw Δ 1910-1992) 플라스미드의 제조:

<94> HBV 유전자 (Galibert et al., Nature 28: 646-650, 1979)의 *Sac* I, *EcoR* I 사이의 절편을 pBluescript SK(+) 플라스미드 (Stratagene, USA)의 *Sac* I, *EcoR* I 자리로 옮긴 후 PCR로 nt. 1910-1992 가 소거된 R059 플라스미드(pBS+ Δ 1910-1992)를 제조하였다. R059 플라스미드의

Sac I, *Eco*R I 사이의 절편을 R015 플라스미드의 *Sac* I, *Eco*R I 자리로 옮겨 R060 플라스미드를 만들었다.

<95> 3-2. R048(pCMV- ayw Δ 1884-2459) 플라스미드의 제조

<96> HBV유전자의 *Sac* I, *Eco*R I(nt. 3182) 사이의 절편을 pCH110 (Pharmacia)의 *Sac* I, *Eco*R I 자리로 옮겨 R046 플라스미드를 만든 후, 151 bp의 *Xba* I 절편(1992-2143)을 소거시킨 R047 플라스미드를 제조하였다. R047 플라스미드의 *Sac* I, *Eco*R I 사이의 절편을 R015 플라스미드의 *Sac* I, *Eco*R I 자리로 옮겨 R048 플라스미드를 만들었다.

<97> 3-3. R056(pCMV- ayw Δ 2143-2459) 플라스미드의 제조

<98> R015 플라스미드의 *Sac* I, *Eco*R I 사이의 절편을 pBluescript II SK(+) (Stratagen, USA.)의 *Sac* I, *Eco*R I 자리로 옮겨 R049 플라스미드를 만들었다. R049 플라스미드의 *Sty* I(nt. 1884)-*Sty* I(nt. 2459) 절편을 역방향 프라이머(reverse primer)의 5' 쪽 말단 부위에 *Sty* I 인식부위를 만든 PCR 생성물인 *Sty* I(nt. 1884)-*Xba* I(nt. 2143) 절편으로 치환시켜 R051 플라스미드를 만들었다. R051 플라스미드의 *Sac* I, *Eco*R I 사이의 절편을 R015 플라스미드의 *Sac* I, *Eco*R I 자리로 옮겨 R056 플라스미드를 만들었다.

<99> Forward primer: 5' CCCGAGCTCTCTGGCTAACTAACTTTTTCACCTCTGCC-3' (*Sac* I site underlined)

<100> Reverse primer: 5'-CCCCCAAGGCGCTGGATCTTCCAAATT-3'

<101> (*Sty* I site underlined)

<102> 3-4. R021(pCMV-ayw Δ 2459-2817) 플라스미드의 제조

- <103> R015 플라스마드의 *Sac* I, *Xho* I (nt. 129) 사이의 절편을 pBlueBacHis2 플라스미드 (Invitrogen, USA.)의 *Sac* I, *Xho* I 자리로 옮겨 R407 플라스미드를 만들었다. R407 플라스미드의 *Sty* I(nt. 2459), *BstE* II(nt. 2817) 사이를 잘라서 클레노우 절편 (Klenow fragment)으로 채우고 (filling-in), 라이게이션(ligation)하여 nt. 2459-2817 을 소거시킨 R018 플라스미드를 만들었다. R018 플라스미드로부터 *BspE* I, *EcoR* I사이의 절편을 R015의 *BspE* I, *EcoR* I 자리로 옮겨 R021 플라스미드를 만들었다.
- <104> 3-5. R022(pCMV-ayw Δ 2662-3182/0) 플라스미드의 제조
- <105> R015 플라스미드를 *BstE* II(nt. 2662)와 *EcoR* I(nt. 3182)으로 잘라서 클레노우 절편으로 채운 후 라이게이션하여 nt. 2662-3182를 소거시킨 R022 플라스미드를 만들었다.
- <106> 3-6. R045(pCMV-ayw Δ 2839-3182/0) 플라스미드의 제조
- <107> 먼저, R015 플라스미드를 *BstE* II(nt. 2817)과 *Sph* I(nt. 1239)로 자른 뒤 pGEM-4Z (Promega, USA)로 옮겨 R701 플라스미드를 만들었다. R701 플라스미드의 *Bgl* II(nt. 2839)와 *EcoR* I(nt. 3182) 절편을 소거하고 클레노우 절편으로 채운 후 라이게이션하여 nt. 2839-3182을 소거시킨 R043 플라스미드를 만든 다음, R043 플라스미드를 *BstX* I으로 자른 절편을 R015 플라스미드의 *BstX* I(nt. 2817-620) 사이의 절편으로 치환하여 R045 플라스미드를 만들었다.
- <108> 3-7. R044(pCMV-ayw Δ 3052-3182/0) 플라스미드의 제조
- <109> R701 플라스미드의 *Bsu36* I(nt. 3052)과 *EcoR* I(nt. 3182) 사이의 절편을 소거하고 클레노우 절편으로 채운 후 라이게이션하여 nt. 3052-3182을 소거시킨 R042 플라스미

드를 만든 다음, R042 플라스미드를 *Bst*X I으로 자른 절편을 R015 플라스미드의 *Bst*X I(nt. 2817-620) 사이의 절편과 치환시켜 R044 플라스미드를 만들었다.

<110> 3-8. R023(pCMV-ayw Δ 3182/0-129) 플라스미드의 제조

<111> R015 플라스마드를 *Eco*R I(nt. 3182)과 *Xho* I(nt. 129)으로 자르고 클레노우 절편으로 채운 후 라이게이션하여 nt. 3182/0-129를 소거시킨 R023 플라스미드를 만들었다.

<112> 3-9. R040(pCMV-ayw Δ 129-490) 플라스미드의 제조

<113> R018 플라스마드의 *Eco*R I(nt. 3182), *Sph* I(nt. 1239) 사이의 절편을 pGEM-4Z(Promega, USA) 플라스미드에 삽입하여 R037 플라스미드를 만들었다. R037 플라스미드를 *Xho* I(nt. 129), *Bam*H I(nt. 490)으로 자른 후 클레노우 절편으로 채우고 라이게이션하여 nt. 129-490을 소거한 R038 플라스미드를 만들었다. R038 플라스미드의 *Eco*R I, *Sph* I사이의 877 bp 크기의 절편을 R015 플라스미드의 *Eco*R I, *Sph* I 자리로 옮겨 R040 플라스미드를 만들었다.

<114> 3-10. R041(pCMV-ayw Δ 490-827) 플라스미드의 제조

<115> R037 플라스미드를 *Bam*H I(nt. 490)과 *Acc* I(nt. 827)으로 자른 후 클레노우 절편으로 채우고 라이게이션하여 nt. 490-827을 소거한 R039 플라스미드를 만들었다. R039 플라스미드의 *Eco*R I, *Sph* I 사이의 897 bp 크기의 절편을 R015 플라스미드의 *Eco*R I, *Sph* I 자리로 옮겨 R041 플라스미드를 만들었다.

<116> 3-11. R025(pCMV-ayw Δ 827-1238) 플라스미드의 제조

<117> R015 플라스미드의 *Eco*R I(nt. 3182)과 *Apa* I사이의 절편을 pBluescript II

SK(+)(Stratagene, USA.)로 옮겨 R050 플라스미드를 만들었다. R050 플라스미드의 *Acc* I(nt. 827)과 *Sph* I(nt. 1238)사이의 절편을 소거하고 T4 DNA 폴리머라제로 채우고 라이게이션하여 nt. 827-1238을 소거한 R008 플라스미드를 만들었다. R008 플라스미드의 *R* I, *Apa* I 절편을 R015 플라스미드의 *Eco*R I, *Apa* I 자리로 옮겨 R025 플라스미드를 만들었다.

<118> 3-12. R026(pCMV-ayw Δ 1238-1374) 플라스미드의 제조

<119> R050 플라스미드를 *Sph* I(nt. 1238), *Nco* I(nt. 1374)로 자른 후 T4 DNA 폴리머라제로 채우고 라이게이션하여 nt. 1238-1374를 소거한 R009 플라스미드를 만들었다. 다음, R009 플라스미드의 *Eco*R I과 *Apa* I 사이의 1866 bp 크기의 절편을 R015 플라스미드의 *Eco*R I, *Apa* I 자리로 치환시켜 R026 플라스미드를 만들었다.

<120> 3-13. R027(pCMV-ayw Δ 1374-1419) 플라스미드의 제조

<121> R050 플라스미드를 *Nco* I(nt. 1374), *Aat* II(nt. 1419)로 자른 후 T4 DNA 폴리머라제로 채운 후 라이게이션하여 nt. 1374-1419를 소거한 R012 플라스미드를 만들었다. 다음, R012 플라스미드의 *Eco*R I(nt. 3182), *Apa* I 사이의 1957 bp 크기의 절편을 R015 플라스미드의 *Eco*R I, *Apa* I 자리로 옮겨 R027 플라스미드를 만들었다.

<122> 3-14. R028(pCMV-ayw Δ 1419-1804) 플라스미드의 제조

<123> R050 플라스미드를 *Aat* II(nt. 1419), *Fsp* I(nt. 1804)로 자른 후 T4 DNA 폴리머라제로 채운 후 라이게이션하여 nt. 1419-1804가 소거된 R013 플라스미드를 만들었다. R013 플라스미드의 *Eco*R I(nt. 3182), *Apa* I 사이의 1617 bp 크기의 절편을 R015 플라스미드의 *Eco*R I, *Apa* I 자리로 옮겨 R028 플라스미드를 만들었다.

<124> 3-15. R053(pCMV-ayw Δ 1419-1804) 플라스미드의 제조

<125> R050 플라스미드의 Aat II(nt. 1419)과 Apa I 사이의 절편을 앞방향 프라이머 (forward primer)의 5' 쪽 말단 부위에 Aat II 인식부위를 만든 PCR 생성물인 Aat II(nt. 1592)-Apa I 절편으로 치환시켜 R052 플라스미드를 만들었다. 다음, R052 플라스미드의 EcoR I, Apa I 사이의 절편을 R015 플라스미드의 EcoR I, Apa I 자리로 옮겨 R053 플라스미드를 만들었다.

<126> 3-16. R035(pCMV- ayw Δ 1607-1804) 플라스미드의 제조

<127> R050 플라스미드를 EcoR I(nt. 3182)-Bsa I(nt. 1607) 사이의 블런트(blunt) 절편을 만든 후, R015 플라스미드를 EcoR I(nt. 3182)-Fsp I(nt. 1804) 사이의 절편과 치환시켜 R035 플라스미드를 만들었다.

<128> 3-17. R029(pCMV- ayw Δ 1804-1884) 플라스미드의 제조

<129> R050 플라스미드의 Fsp I(nt. 1804)-Sty I(nt. 1884)사이의 절편을 소거하고 클레노우 절편으로 채운 후 라이게이션 하여 nt. 1804-1884를 소거한 R010 플라스미드를 만들었다. 다음, R010 플라스미드의 EcoR I(nt. 3182), Apa I 사이의 1922 bp 크기의 절편을 R015 플라스미드의 EcoR I, Apa I 자리로 옮겨 R029 플라스미드를 만들었다.

<130> 실시예 4: HBV 게놈 복제에 필수적인 시스-엘리먼트의 분석

<131> 4-1. 코아 입자로부터 HBV DNA 추출 및 써던 블롯

<132> 트랜스팩션, DNA 추출과 써던 블롯을 실시예 2-2와 동일하게 실시하였다. HBV 유전자 복제에 필요한 바이러스의 단백질을 제공하기 위해, 코아 단백질과 폴리머라제를

제공할 수 있는 헬퍼 플라스미드(R063, pCMV-CPS)를 함께 트랜스팩션 하였다. 도면 7에서 17종의 결손 변이체들의 써던 블롯 결과를 보여주고 있다. HBV 유전자 복제 기전에 서 설명하였듯이 코아입자에 존재하는 HBV 유전자 복제의 중간체는 SS(단일-가닥 DNA), DL(이중-가닥 DNA), RC(relaxed circular DNA, 릴렉스드 환형) 형태로 존재한다. 이중에서 RC(릴렉스드 환형)형태의 DNA가 바이러스 입자 (virion particle)에 존재하는 HBV 게놈 복제의 최종 산물이므로 RC 형태 DNA의 존재여부로 각 결손 변이체에 결손된 염기 서열이 복제에 필요한 시스-엘리먼트 인지 판단할 수 있다.

<133> 4-2. 시스-엘리먼트 분석

<134> HBV복제에 필요한 시스- 엘리먼트를 규명하고자 제한효소 자리를 이용하여 여러 개의 결손 변이체를 제조하였다. 이들 결손 변이체는 각각 약 0.1-0.4 K bp의 조각의 소거로 모두 합하면 HBV 전체 게놈을 포함한다.

<135> 써던 블롯 결과를 분석해보면, R022 플라스미드 (pCMV-ayw /2662-3182/0)를 트랜스팩션 한 경우 RC DNA는 검출되지 않았고 SS DNA만이 검출되었다 (도면 7, 표1). 이 부위를 좀더 세분하게 규명하기 위하여 R022 플라스미드를 R045 플라스미드 (pCMV-ayw /2839-3182/0)과 R044 플라스미드 (pCMV- ayw /3052-3182/0)로 구분한 뒤 써던 블롯을 수행하였다. 그 결과, R044 플라스미드는 SS DNA, DL DNA 뿐 아니라 RC DNA가 검출되었으므로 R044의 결손부위는 복제에 불필요함을 알 수 있었다 (도면 7, 표1). 반면에, R045 플라스미드는 적은 양의 SS DNA만이 검출되었으므로 R045 플라스미드의 결손 부위 (nt. 2839-3182/0)가 복제에 필요한 부위를 포함하고 있음을 알 수 있었다 (도면 7, 표 1). 한편, R021 플라스미드 (pCMV- ayw /2459-2817)은 SS DNA, DL DNA 뿐 아니라 RC DNA가 검출되었으므로 R021의 결손부위는 복제에 불필요하다 (도면 7, 표1). 상기 네

가지 결손 변이체의 결과로부터 (nt. 2818-3052)가 새로운 시스-엘리먼트임을 알 수 있었다. 본 발명에서 이 부위를 알파-엘리먼트(α)로 명명하였다.

<136> R028 플라스미드 (pCMV- ayw Δ 1419-1804)은 DR2(nt. 1592-1602)가 결손되어 있는 변이체이다. R028 플라스미드의 써던 블럿 결과를 보면 RC (relaxed circular) DNA가 나타나지 않고, 단일 가닥 DNA만이 감지되었다 (도면 7, 표1). 이 결과로 DHBV에서 마이너스-가닥 DNA 합성에 DR2가 중요한 역할을 한다는 보고와 일치한다 (Loeb et al., J. Virol. 70: 8684-8690, 1996; Condreay et al., Virology 188:208-216, 1992). 이를 확인하고자 DR2 부분 앞까지만 소거한 R053 플라스미드 (pCMV- ayw Δ 1419-1592)를 만들어 써던 블럿을 실시한 결과, RC DNA를 확인하였다 (도면 7, 표1). 그러므로, R028 플라스미드는 새로운 시스-엘리먼트를 포함한 것이 아니라 DR2 엘리먼트 (nt. 1592-1602)가 결손되어 있어 RC (relaxed circular) DNA가 나타나지 않음을 알 수 있었다.

<137> 한편, R035 플라스미드 (pCMV- ayw Δ 1607-1804)는 DR1과 DR2 사이가 결손된 변이체로 DNA 합성이 전혀 일어나지 않았다 (도면 7, 표1). 마이너스-가닥 DNA 합성의 개시 부위(initiation 자리)인 DR1이 존재하지만, 복제가 일어나지 않으므로 DR1과 DR2 사이의 염기서열은 복제에 필요함을 알 수 있었다. 즉, 이 부분은 마이너스-가닥 DNA 합성에 필요하다. 이 부분은 새로운 시스-엘리먼트이므로 베타-엘리먼트(β)로 명명하였다.

<138> R029 플라스미드 (pCMV- ayw Δ 1804-1884)는 DR1(nt. 1826-1836)이 결손된 변이체로서 마이너스-가닥 DNA 합성이 전혀 감지되지 않았다 (도면 7, 표1). 이것은 문헌의 보고와 일치된 결과를 보여주고 있다 (Condreay et al., Virology 188:208-216, 1992).

<139> 결론적으로, 본 발명에서는 HBV 유전자 복제에 필요한 두개의 새로운 시스-엘리먼트

트들을 규명하였다. 이러한 써던 블릿의 결과로 인해 HBV 복제기전에서 중요한 시스-엘리먼트에 대한 종합적인 이해로 원형(prototype)의 HBV 벡터를 설계할 수 있었다.

<140> 한편, HBV 유전자의 일부는 HBV 유전자 복제에 불필요한 결손가능부위(despensable region)로 밝혀졌다. 결손되어도 RC(relaxed circular) DNA를 형성할 수 있는 것으로 나타난 결손 변이체들은 R060 (pCMV- ayw Δ 1910-1992), R048 (pCMV- ayw Δ 1992-2143), R056 (pCMV- ayw Δ 2143-2459), R021 (pCMV- ayw Δ 2459-2817), R044 (pCMV- ayw Δ 3052-3182/0), R023 (pCMV- ayw Δ 3182/0-129), R040 (pCMV- ayw Δ 129-490), R041 (pCMV- ayw Δ 490-827), R025 (pCMV- ayw Δ 827-1238), R026 (pCMV- ayw Δ 1238-1374), R027 (pCMV- ayw Δ 1374-1419), R053 (pCMV- ayw Δ 1419-1592)을 포함한다.

<141> [표 1] 결손 변이체의 결손위치에 따른 복제 여부를 요약한 표

<142>

표 1. HBV 결손변이체의 유전자 복제능의 결과 요약

결손변이체	결손 위치	결손 크기 (bp)	유전자 복제능
R060	1910-1992	81	+++
R048	1992-2143	151	+++
R056	2143-2459	316	+++
R021	2459-2817	358	+++
R022	2662-3182/0	520	-
R045	2839-3182/0	343	-
R044	3052-3182/0	136	+++
R023	3182/0-129	129	++
R040	129-490	361	+
R041	490-827	347	+
R025	827-1238	411	+++
R026	1238-1374	136	+++
R027	1374-1419	45	++
R028	1419-1804	385	-
R053	1419-1592	173	+++
R035	1607-1804	197	-
R029	1804-1884	80	-

<143>

실시에 5: 원형(prototype) HBV 유전자 치료 벡터 설계

<144>

본 발명에서는 HBV 유전자 복제에 필요한 새로운 시스-엘리먼트들을 모두 규명하였다. 문헌상에서는 HBV 게놈 복제 단계에 중요한 엘리먼트가 몇가지 이미 밝혀져 있다. 이 엘리먼트들은 캡시드화의 신호로 쓰이는 5' 쪽 엡실론 (Junker-Niepmann et al.,

EMBO J. 9:3389-3396,1990; Hirsch et al., J. Virol. 65: 3309-3316,1991), DR1과 DR2 엘리먼트 (Condreay et al., Virology 188:208-216,1992; Seeger et al, J. Virol. 65:5190-5195,1991; Nassal et al., J. Virol. 70:2764-2773,1996), 원형화 (circularization)에 작용하는 r (repeat) 엘리먼트 (Loeb et al., J. Virol. 71: 152-160,1997), post-transcriptional RNA processing에 필요한 PRE 엘리먼트 (Huang et al, Mol. Cell. Biol. 15: 3864-3869,1995; Yen et al., Virology. 1998 248:46-52,1998)등이 있다. 이밖에, 본 발명에서는 전체 HBV 게놈의 맵핑(mapping)을 통해 두 가자의 새로운 시스-엘리먼트를 규명하였다.

<145> HBV 유전자 복제에 필수적인 시스-엘리먼트들을 규명함으로써 원형 (prototype)의 HBV 유전자 치료 벡터를 설계할 수 있는 초석을 마련했다 (도 8 참고). HBV 유전자 치료 벡터 개발에 있어 가장 고려해야할 점은 이중유전자의 삽입 위치와 이중유전자의 크기일 것이다. 본 발명에서는 원형 (prototype)의 HBV 유전자 치료 벡터를 개발하기 위해 2개의 이중 유전자의 삽입 가능부위를 선정하였다. 먼저, 5' 쪽 엡실론 (ϵ)과 알파 (α)-엘리먼트 (nt. 1909-2817)사이에 HBV 유전자를 이중 유전자의 치환이 가능할 것이다. 이 삽입부위에 적어도 0.9 K bp 크기의 이중유전자 DNA 절편의 삽입이 가능할 것이다. 더군다나, 이 삽입부위의 상부 (upstream)에 위치하여 코아 프로모터 (core promoter)를 삽입된 이중유전자 발현에 활용하게된다. 두 번째로, 알파(α)-엘리먼트와 DR2 엘리먼트 사이를 이중유전자로 치환시킬 수 있다. 여기서는 1.7 K bp 크기의 DNA 절편을 이중유전자로 치환시킬 수 있다. 첫 삽입부위와 유사하게, 두 번째 삽입 부위의 상부에 프리(pre)-S2/S 프로모터 (promoter)가 위치하고있다. 그러므로, 이 부위에 삽입한 이중유전자는 프리(pre)-S2/S 프로모터 (promoter)를 이용하여 발현할 수 있다.

<146> 실시예 6: 이중유전자가 삽입된 HBV vector의 제조

<147> 실시예 5에서 설계된 HBV 벡터의 결손가능부위에 외부 유전자를 삽입하여 그 복제를 조사하기 위해 이중유전자인 녹색형광단백질 (GFP, green fluorescent protein) 유전자를 삽입시킨 R711 플라스미드 (pCMV-HBV/GFP)를 제조하였다. (도면 9 참고)

<148> 6-1. 삽입 부위와 프로모터 (promoter)

<149> 다음과 같은 사항을 고려하여 삽입 부위를 결정하였다. 첫째, HBV 게놈 복제에 필수적인 모든 시스-엘리먼트는 존재하여야 한다. 둘째, 최대 패키징될 수 있는 크기 (packaging limit)를 넘지 않는 범위에서 발현 능력을 가진 내재 바이러스 프로모터가 필요하다.

<150> 6-2. 녹색형광단백질(GFP) 유전자의 HBV벡터로의 삽입

<151> 외부 유전자가 삽입된 재조합 HBV 벡터를 제조하기 위해 약 0.7 K bp의 녹색형광단백질 (GFP) 유전자를 HBV 벡터에 삽입하였다. 우선, 녹색형광단백질 (GFP) 유전자를 PCR 생성물로 만든 다음, 이 때 GFP PCR 산물의 양끝에는 프라이머를 통해 만들어진 제한효소 인식 부위가 생성되도록 제작하였다. 먼저, R709 플라스미드 (pCMV-HBV/ΔP_{S2} GFP)는 R015 플라스미드의 Bsu36 I(nt. 3052)-EcoR I(nt. 3182)사이의 절편을 양쪽 끝에 Bsu36 I-EcoR I 제한효소 인식부위를 가진 0.7 K bp 크기의 GFP 유전자를 발현하는 PCR 생성물로 치환시켜 만들었다. 구체적으로, 프라이머 GFP BsuFII의 5'말단으로부터 클로닝을 위한 Bsu36I의 제한효소 인식부위를, 그리고 프라이머 GFPEcoRII의 5'말단에 EcoRI의 제한효소 인식부위를 넣어서 PCR에 이용하였다.

<152> 구체적인 염기 서열은 다음과 같다.

<153> GFPBsuFII ;

<154> 5-GTCACTCCTCAGGCCATGAGTAAAGGAGAAG -3

<155> *Bsu* 36I

<156> GFPEcoRII ;

<157> 5-GGAATTCCTTATTTGTATAGTTCATC -3

<158> *EcoR* I

<159> 일련의 클로닝과정 중에서 프리(pre)-S2/S 프로모터(promoter)의 일부가 결손된다.

결손된 pre-S2/S 프로모터 부위를 복구하기 위해, *Bsu*36 I(nt. 3052)-*Bsu*36 I(nt. 3166) 사이의 절편을 R709 플라스미드에 삽입하여 R710 플라스미드 (pCMV-preHBV/GFP)를 만들었다. 그 다음, R711 플라스미드(pCMV-HBV/GFP)를 만들기 위해 R710 플라스미드의 *EcoR* I(nt. 3182)-*Sph* I(nt. 1238)사이의 절편을 소거하였다. 결국, 1.3 K bp 크기의 HBV 유전자 일부가 0.7 K bp의 GFP 유전자로 치환된다. 그러므로, 벡터는 전체 게놈 크기가 1.3 K bp 정도가 소거되고 GFP 유전자인 0.7 K bp가 첨가되어 HBV 게놈 크기보다 0.6 K bp가 작아지게 만들었다.

<160> 실시예 7: 재조합 HBV 유전자 벡터의 복제 확인

<161> 재조합 HBV 벡터의 복제 능력을 확인함으로써 유전자 치료 벡터로서의 유용성을 확인하였다. R711 플라스미드와 pCMV-CPS(헬퍼, Helper)를 Huh7 세포에 트랜스팩션 하였

다. 실시예 2-2와 같이 코아 DNA를 추출하고, HBV 프로브(probe)를 이용한 써던 블롯하였다 (도면 11a). 대조군(control)으로 HBV를 생산하는 간암세포주인 HepG2.2.15 세포에의 코아입자에서 추출한 DNA를 비교 분석하였다 (Sells et al., J Virol.62:2836-44,1988). 도면 11a에서와 같이 양성대조군인 HepG2.2.15 세포와 R015 플라스미드가 트랜스팩션된 세포에서 RC(relaxed circular) DNA, DL(double-stranded linear) DNA, SS (single-stranded) DNA등이 검출되었다. 더군다나, R711 플라스미드를 트랜스팩션시켰을 때의 경우에도, RC DNA가 보이는 것을 확인할 수 있었다. 더욱이, RC DNA의 양이 야생형 HBV 클론인 R015 플라스미드를 트랜스팩션한 경우와 비슷하다는 것도 확인할 수 있었다. 또한, 도면 11b에서 GFP 프로브(probe)를 이용한 써던블롯 결과에서 R711 플라스미드 벡터의 복제능력을 재확인할 수 있었다. 결론적으로, 본 발명이 제공하는 원형의 HBV벡터는 이중 유전자를 삽입하여도 복제능 (replication competent)에 손상이 없으므로 유용한 유전자 치료벡터로의 가능성이 입증되었다.

<162> 플라스미드 R711 (pCMV-HBV/GFP)는 HBV 게놈의 크기가 야생형과 비교하여 0.6 K bp 작다. HBV 게놈의 크기가 마이너스-가닥의 이동(translocation)에 영향을 줄 수 있으므로 (HO et al., 2000). 이를 보완하기 위해 야생형의 게놈크기와 동일한 R712 (pCMV-HBV/GFP3.2) 플라스미드를 제작하였다. R712 플라스미드는 R710 플라스미드의 EcoR I(nt.3182)-Apa I 절편을 소거하고, PCR을 이용하여 앞방향 프라이머(forward primer)의 5' 쪽 말단 부위에 EcoR I 인식부위를 만든 PCR 생성물인 EcoR I(nt.732)-Apa I 절편으로 치환시켜 R712 플라스미드를 만들었다. 프라이머의 구체적인 염기 서열은 다음과 같다.

<163> EcoRI732F;

<164> 5-GGAATTCCTTCAGTTATATGGAT -3

<165> *EcoR I*

<166> HBVECTOR-R2;

<167> 5-TAGAATAGGGCCCTCTAGAA -3

<168> *Apa I*

<169> R712 플라스미드는 소거된 HBV크기만큼 이중유전자가 들어가 있으므로 전체 크기가 야생형과 동일하다. R712 플라스미드를 트랜스팩션시켰을 때의 경우, R711과 마찬가지로 써던 블롯 결과에서 RC DNA를 확인할 수 있었다.

<170> R711과 R712의 서열정보는 서열목록 4와 5에 각각 나타내었다.

【발명의 효과】

<171> 상기한 구성의 본 발명에 따르면, 본 발명에서 제공하는 재조합 바이러스는 간세포에만 선택적으로 감염하여 치료용 유전자를 전달하는 특성이 있으므로 in vivo 치료와 ex vivo 치료가 가능한 장점이 있으며, 이러한 새로운 유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 벡터는 간 조직에 DNA를 직접 삽입, 순환 등의 방법으로 주입 (administration)시키면 간으로 이중 유전자를 전달하고 발현시키는데 직접 이용이 가능하다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

HBV 게놈 복제에 필수적인 새로운 두 가지의 시스-엘리먼트인 서열목록 1에 기재된 알파-엘리먼트 및 서열목록 2에 기재된 베타-엘리먼트 서열을 포함하는 원형 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서,

상기의 벡터는 5' 쪽에서부터 3' 쪽까지의 사이토메갈로 바이러스의 초기프로모터, DR1 엘리먼트, 엡실론 엘리먼트, 제 1항의 알파-엘리먼트, DR2 엘리먼트, 제 1항의 베타-엘리먼트, DR1 엘리먼트를 포함하는 서열목록 3에 기재된 원형 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터.

【청구항 3】

제 2 항에 있어서,

상기의 엡실론과 상기의 알파-엘리먼트 사이에 외래 유전자 삽입 부위를 갖는 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터.

【청구항 4】

제 2 항에 있어서,

상기의 알파-엘리먼트와 상기의 DR2 사이에 외래 유전자 삽입 부위를 갖는 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터.

【청구항 5】

제 2 항에 있어서,

상기의 벡터는 HBV 유전자 중 내부바이러스 프로모터를 사용하는 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터.

【청구항 6】

제 2 항에 있어서,

상기의 벡터는 HBV 유전자 중 내부바이러스 프로모터 중에서 코아 프로모터와 프리 S2/S 프로모터를 각각 선택하여 사용하는 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터.

【청구항 7】

제 2 항에 있어서,

상기의 벡터는 야생형 3.2 K bp HBV 게놈의 크기를 증가시키지 않고 상기의 엡실론 엘리먼트와 상기의 알파 엘리먼트 사이에 0.90 K bp까지 삽입할 수 있는 유전자 치료용 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터.

【청구항 8】

제 2 항에 있어서,

상기의 벡터는 야생형 3.2 K bp HBV 게놈의 크기를 증가시키지 않고 상기의 알파 엘리먼트와 상기의 DR2 엘리먼트 사이에 1.7 K bp까지 삽입할 수 있는 유전자 치료용 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터.

【청구항 9】

제 2 항에 있어서,

상기의 벡터는 복제에 필수적인 코아 단백질 혹은 폴리머라제 유전자가 결손된 복제불능인 유전자 치료용 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터.

【청구항 10】

제 2 항에 있어서,

상기의 벡터는 적어도 한 개의 이중유전자를 발현할 수 있는 이중 염기서열을 포함하는 유전자 치료용 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터.

【청구항 11】

B형 간염바이러스의 캡시드화에 필수적인 엠실론 엘리먼트가 결손되어 복제할 수 없지만 B형 간염바이러스의 단백질을 발현하여, 재조합 HBV 벡터에 바이러스 유전자 복제에 필요한 단백질을 발현하는 헬퍼 플라스미드

【청구항 12】

제 10 항의 재조합 HBV 벡터와 제 11항의 헬퍼 플라스미드를 간 세포주에 함께 트랜스팩션하여 재조합 HBV 입자 제조 방법:

상기에서 제10항의 재조합 HBV 벡터는 바이러스 유전자 복제에 필수적인 시스-엘리먼트를 포함하며, 적어도 한 개의 유전자 치료용 이중유전자를 발현할 수 있으며, 또한 바이러스 유전자 복제에 필요한 바이러스 유전자 중 적어도 한가지를 발현할 수 없으며, 제 11항의 헬퍼 플라스미드는 바이러스 유전자 복제에 필요한 단백질 중 적어도 한가지를 발현할 수 없는 재조합 HBV 벡터에게 이 결핍된 단백질을 제공하여 재조합 HBV 벡터를 보완하여 감염성있는 바이러스를 생산할 수 있어야 하고, 상기의 간 세포주는 복제에 필요한 단백질이 제공되면 재조합 HBV 벡터가 복제할 수 있는 간 세포주이다.

【청구항 13】

제 12 항에 있어서,

상기의 간세포는 인간의 간세포, 조류의 간세포, 설치류의 간세포의 집단으로부터 선택된 간세포인 것을 특징으로 하는 재조합 HBV 입자 제조 방법.

【청구항 14】

제 12 항의 재조합 HBV 입자를 혈관 내 또는 간 조직 내 투여 방법으로 표적세포에 감염 방법.

【청구항 15】

제 14 항에 있어서,

상기의 표적세포의 집단은 인간의 간세포를 포함하는 것을 특징으로 하는 감염 방법.

【청구항 16】

제 14 항에 있어서,

상기의 삽입할 수 있는 외부 유전자는 다양한 유전자에 대한 안티센스 유전자와 라이보자임을 포함하며, 특히 B형 간염바이러스와 C형 간염바이러스의 안티센스 유전자와 라이보자임을 만드는 유전자를 포함한다. 또한, 다양한 암 억제 유전자, 성장 인자, 호르몬, 사이토카인, 세포막 수용체, 혈액 응고 인자로 구성된 이중 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 감염 방법.

【청구항 17】

HBV에 만성 감염된 환자의 간 조직내로 직접 외래 유전자가 삽입된 재조합 HBV 벡터 DNA의 주입방법을 포함하는 재조합 HBV 입자를 표적세포에 감염 방법.

【청구항 18】

제 17 항에 있어서,

상기의 표적세포의 집단은 인간의 간세포를 포함하는 것을 특징으로 하는 감염 방법.

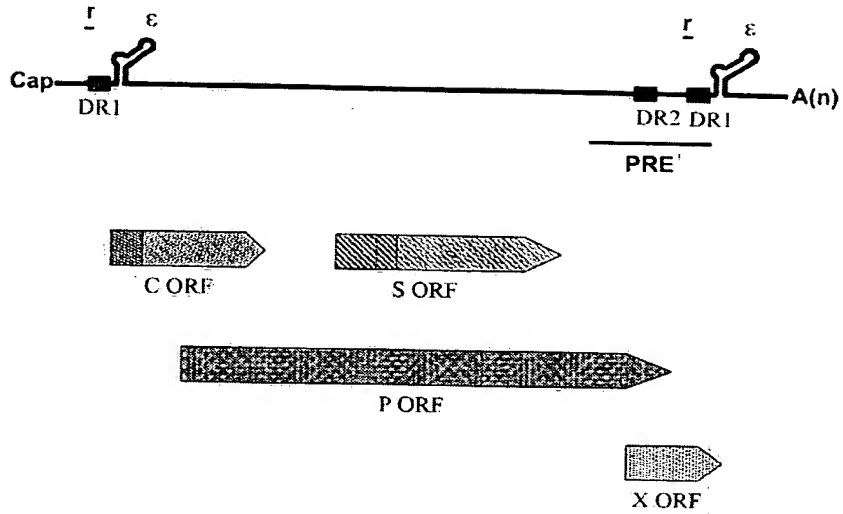
【청구항 19】

제 17 항에 있어서,

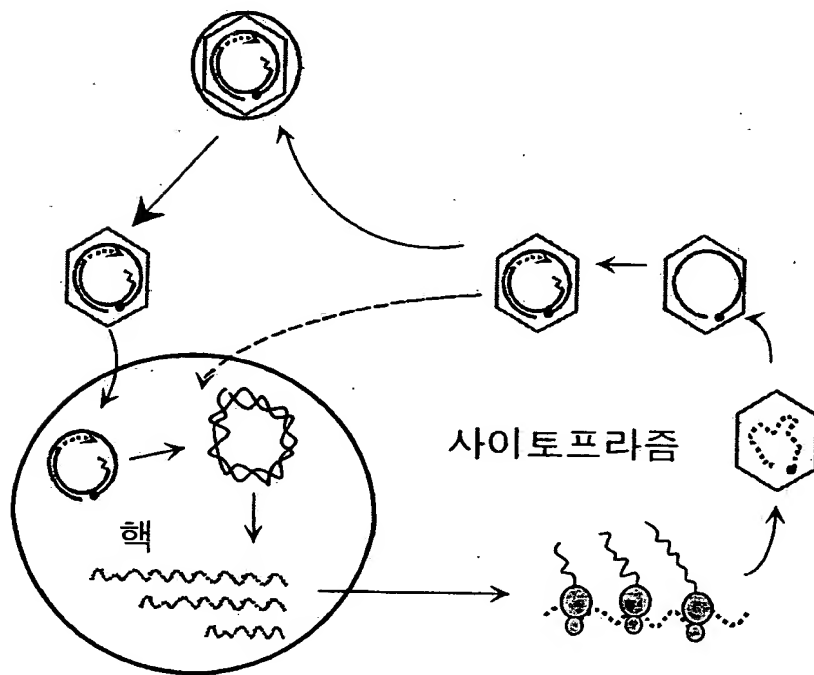
상기의 삽입할 수 있는 외부 유전자는 다양한 유전자에 대한 안티센스 유전자와 라이보자임을 포함하며, 특히 B형 간염바이러스와 C형 간염바이러스의 안티센스 유전자와 라이보자임을 만드는 유전자를 포함한다. 또한, 다양한 암 억제 유전자, 성장 인자, 호르몬, 사이토카인, 세포막 수용체, 혈액 응고 인자로 구성된 이중 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 감염 방법.

【도면】

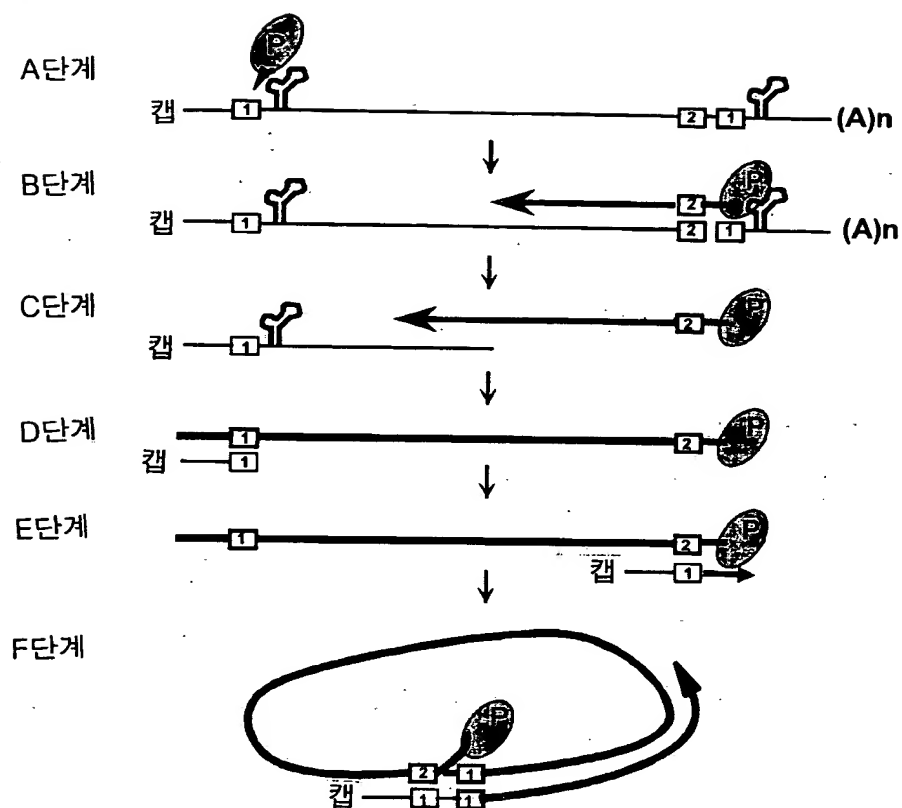
【도 1】



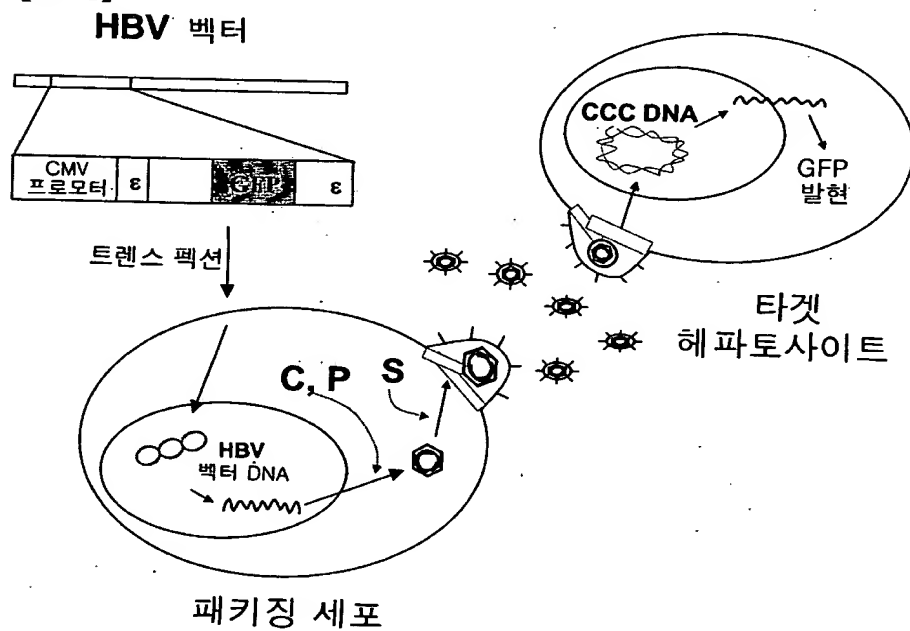
【도 2】



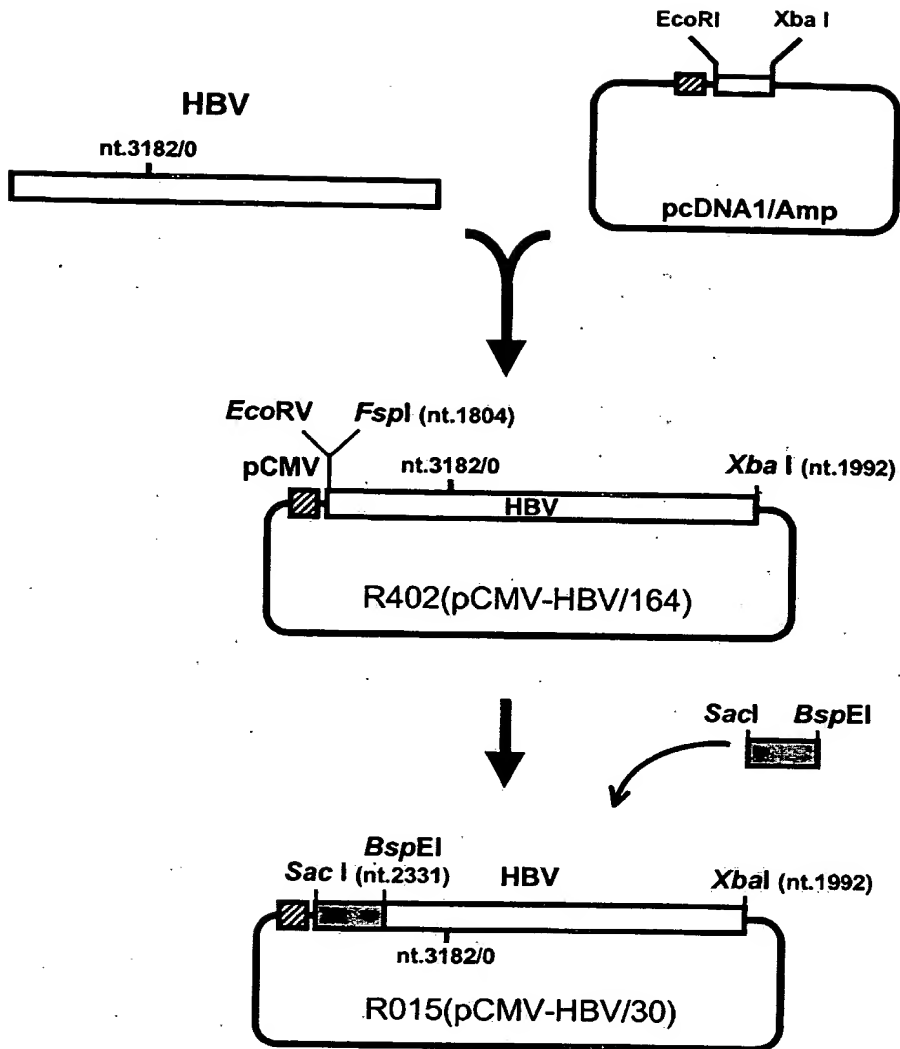
【도 3】



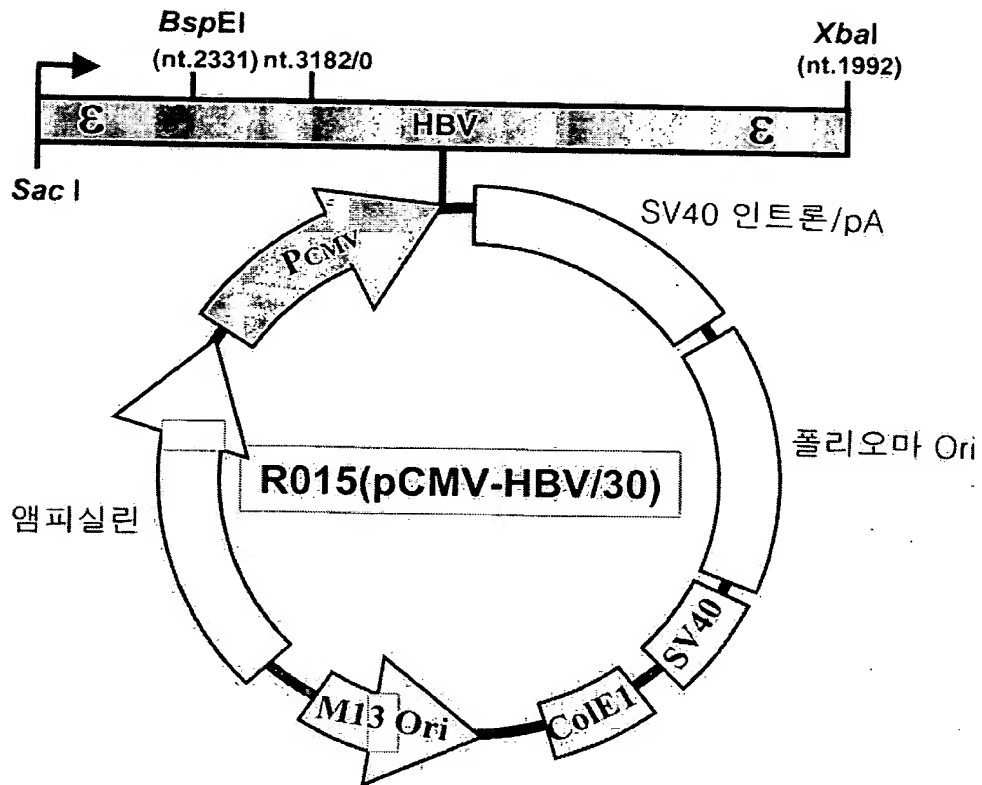
【도 4】



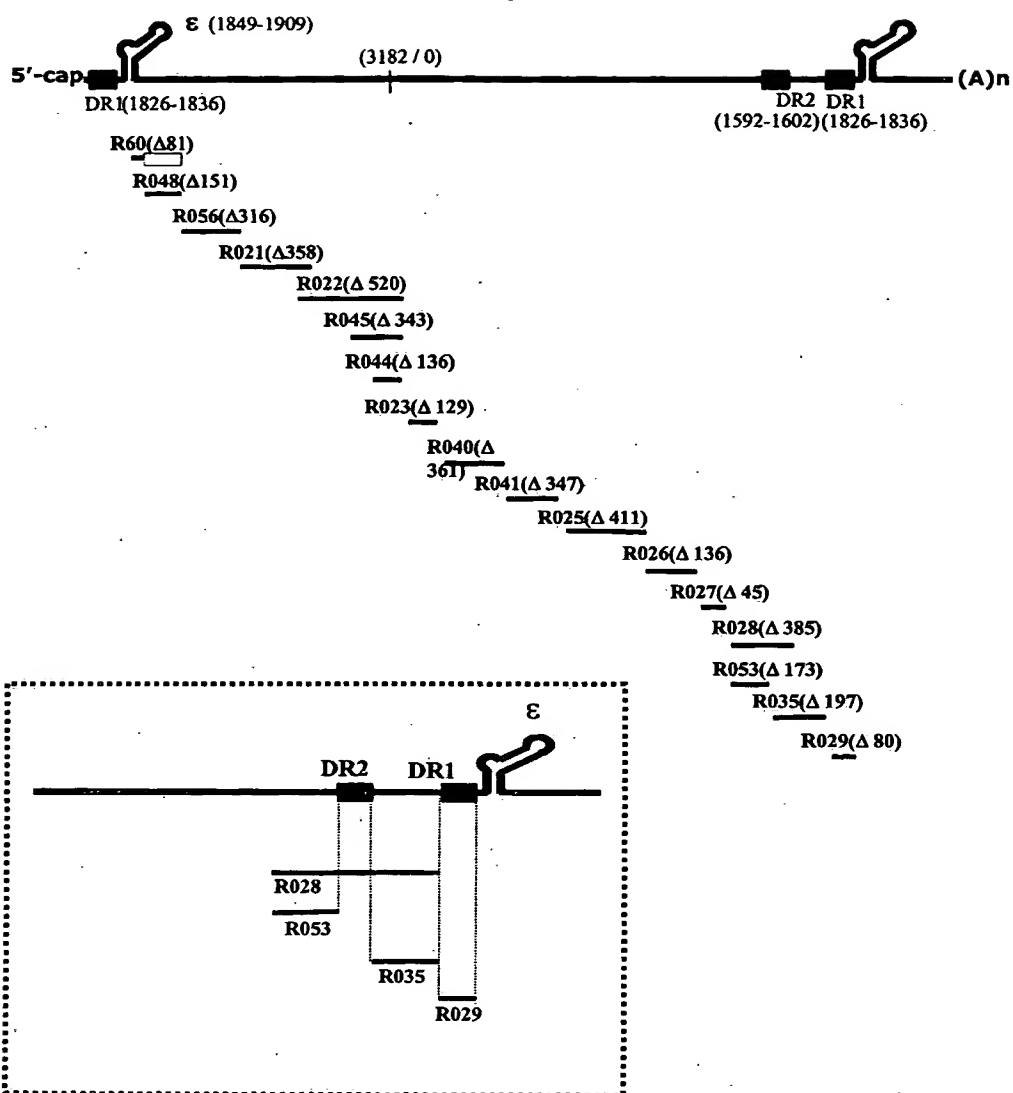
【도 5a】



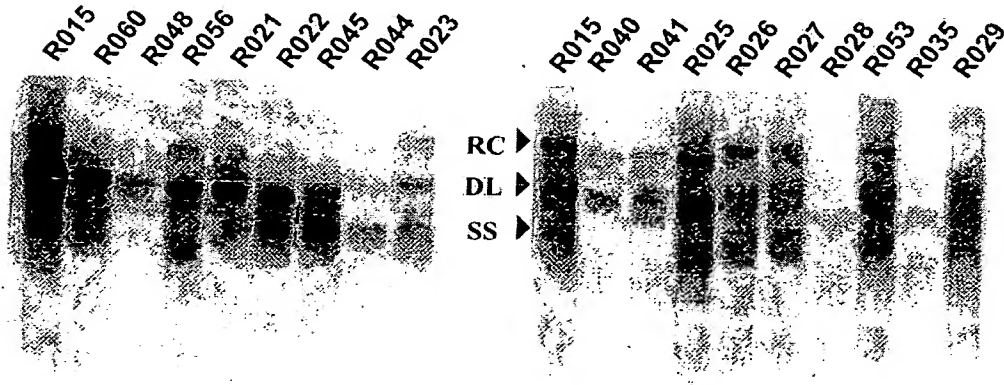
【도 5b】



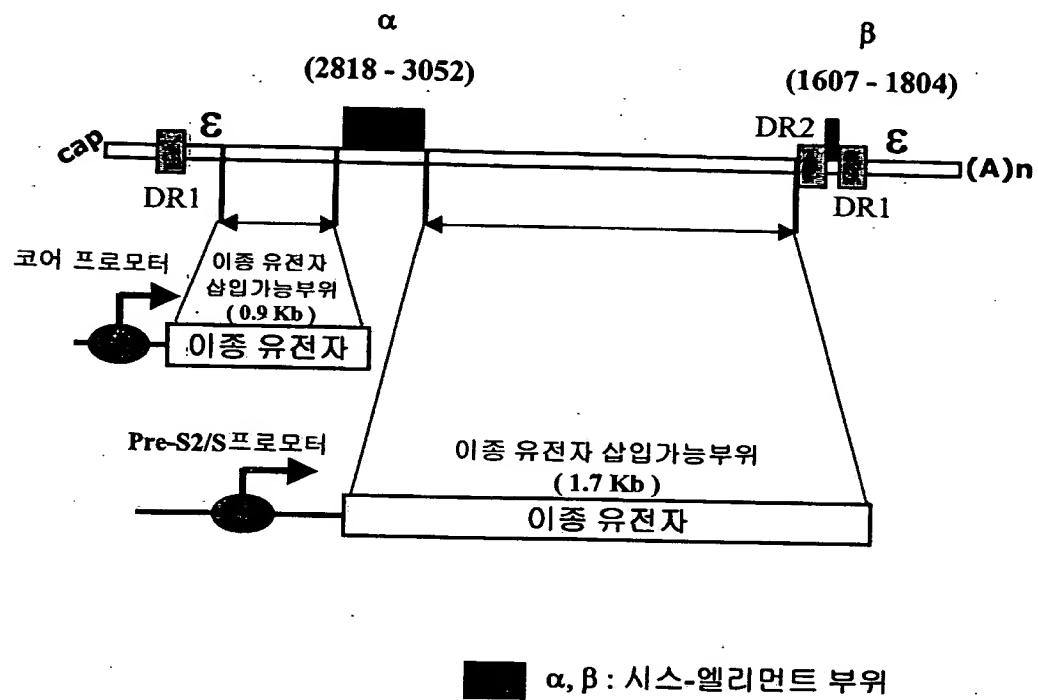
【도 6】



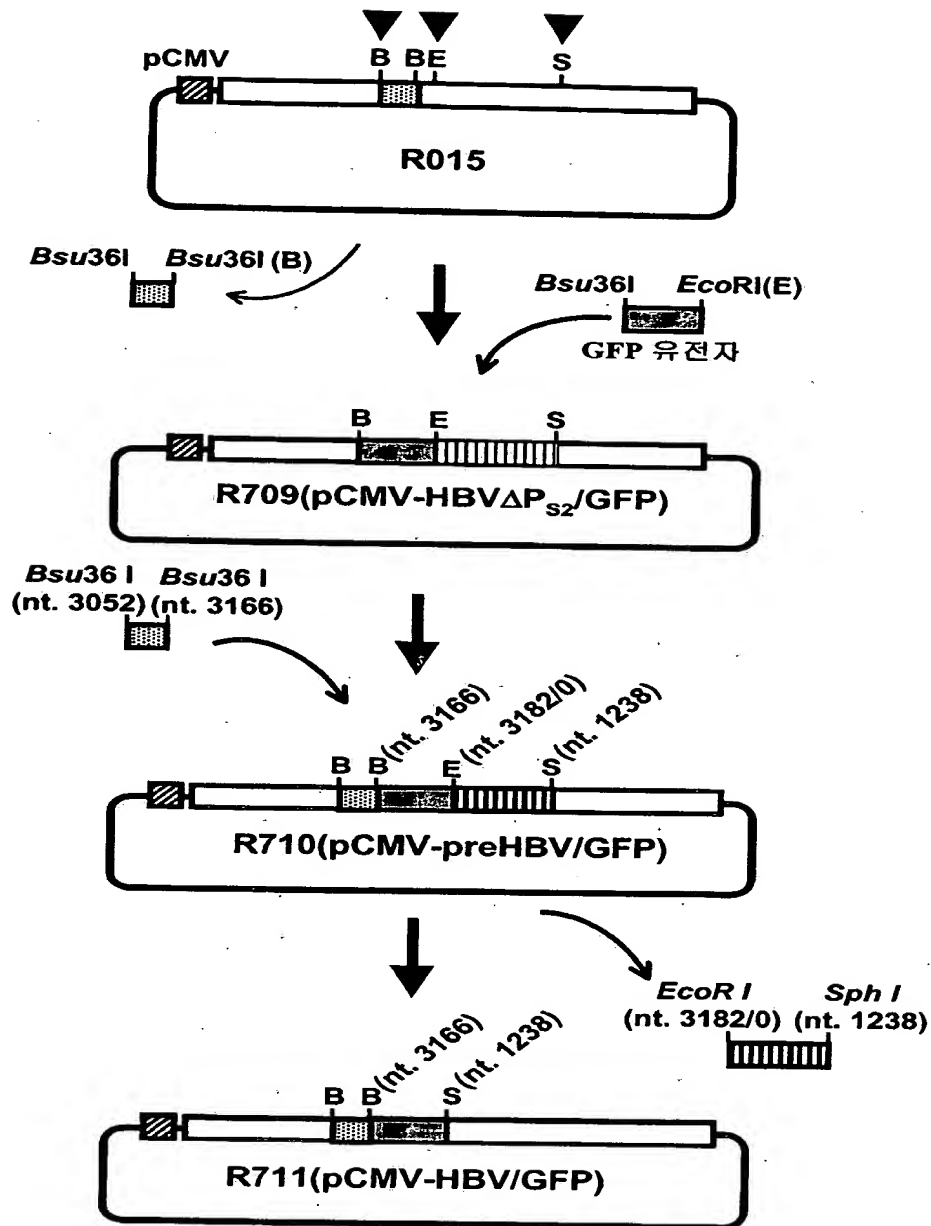
【도 7】



【도 8】

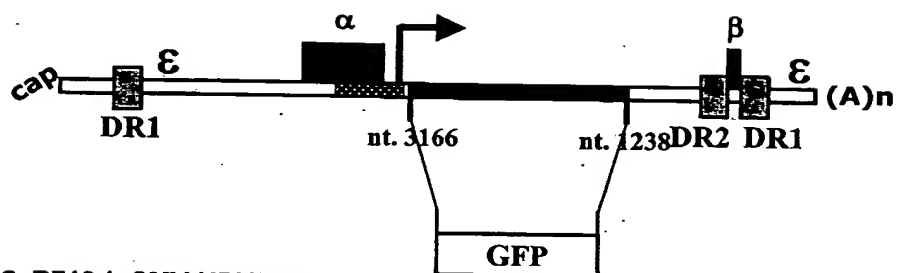


【도 9】

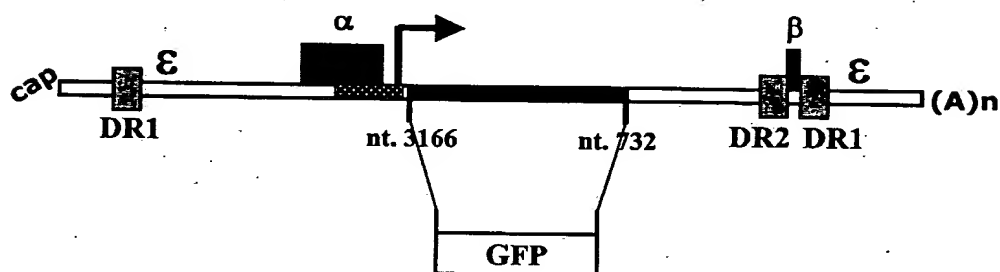







【도 10】

1. R711 (pCMV-HBV/GFP)

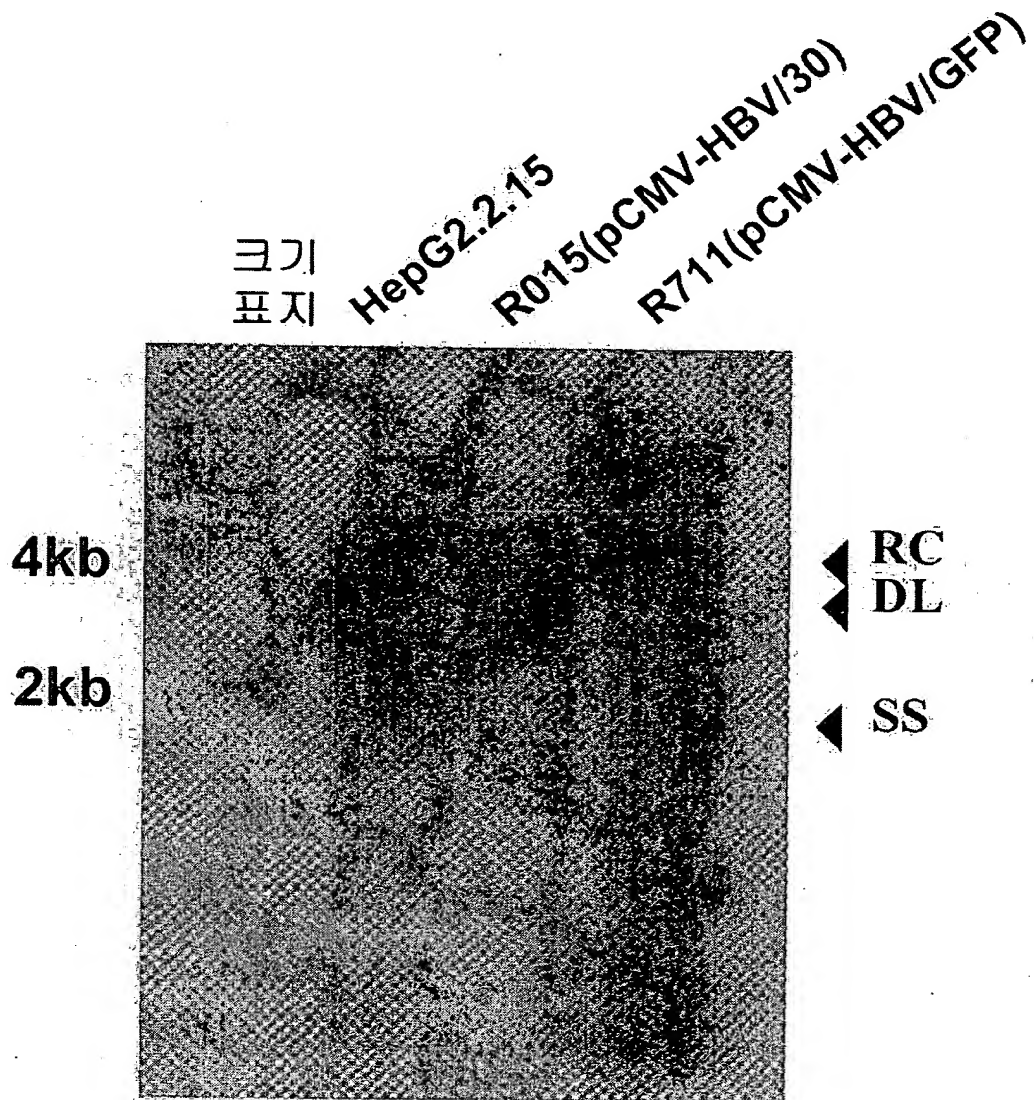


2. R712 (pCMV-HBV/GFP3.2)

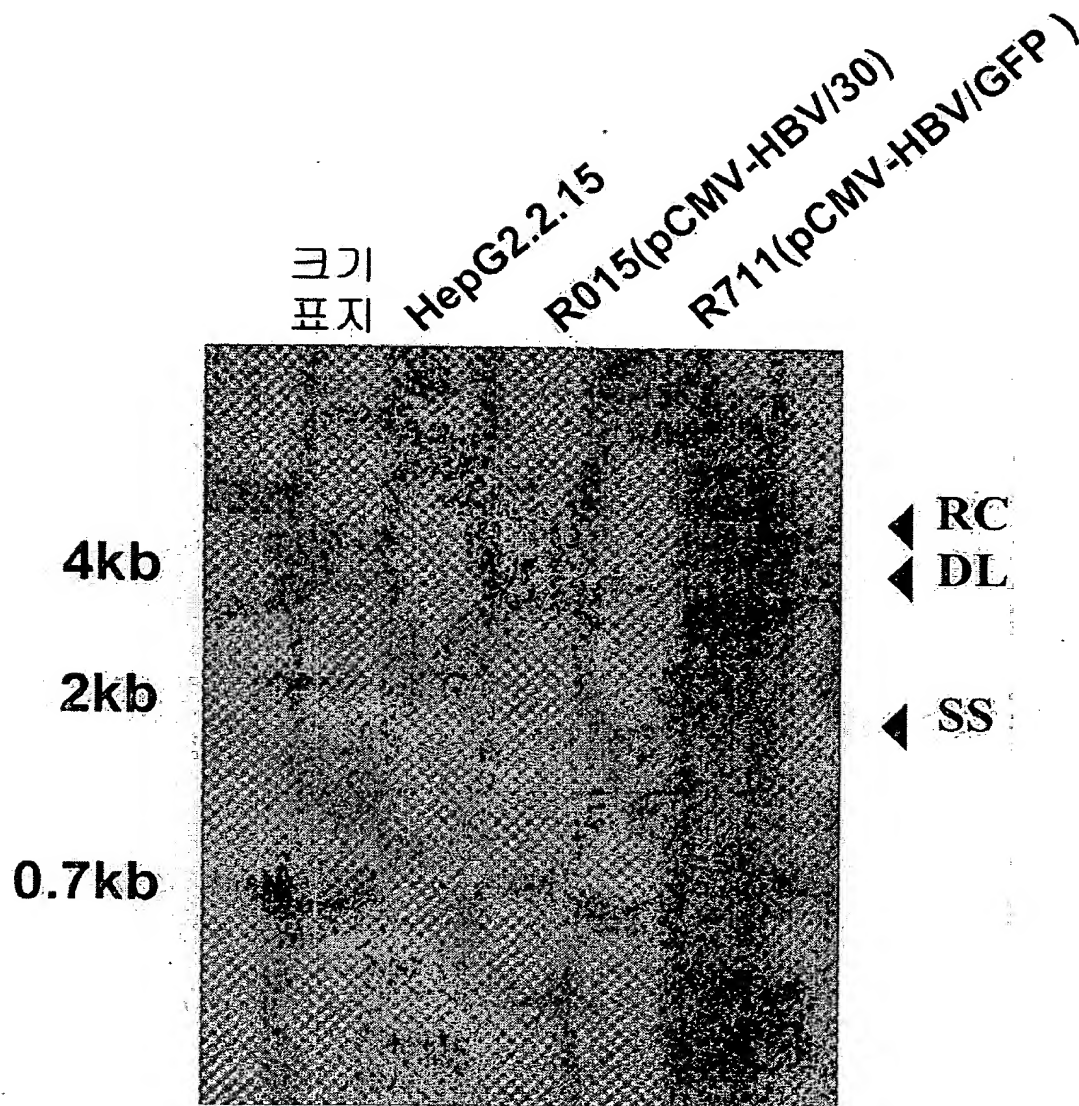


-  Pre-S2/S 프로모터 부위
-  α , β 시스-엘리먼트 부위
-  DR1, DR2
-  GFP (녹색형광단백질)
-  전사개시 부위

【도 11a】



【도 11b】



【서열목록】

<110> RYU, WANG SHICK <120> Hepatitis B virus vectors for gene
therapy <150> KR2000-21070 <151> 2000-04-20 <160> 5
<170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 235 <212> DN

<213> HBV <220> <221> gene <222> (1)..(235)
 <223> Alpha-element of HBV <400> 1 gtcacatat tcttgggaac aagatctac
 gcatggggca gaatctttcc accagcaatc 60 ctctgggatt ctttcccgac caccagttag
 atccagcctt cagagcaaac accgcaaatc 120 cagattggga cttcaatccc aacaaggaca
 cctggccaga cgccaacaag gtaggagctg 180 gagcattcgg gctgggtttc accccaccgc
 acggaggcct tttgggggtg agccc 235 <210> 2 <211> 197
 <212> DNA <213> HBV <220> <221> gene <222>
 (1)..(197) <223> Beta- element of HBV <400> 2 gcatggagac caccgtgaa
 gccacacaaa tattgcccaa ggtcttacat aagaggactc 60 ttgactctc agcaatgtca
 acgaccgacc ttgaggcata cttcaaagac tgtttgttta 120 aagactggga ggagtgggg
 gaggagatta ggtaaaggt ctttgtacta ggaggctgta 180 ggcataaatt ggtctgc
 197 <210> 3 <211> 8007 <212> DNA <213> HBV
 <220> <221> gene <222> (1)..(8007) <223> Prototype
 vector of HBV <400> 3 aactttttca cctctgccta atcatctctt gttcatgtcc tactgttca
 gcctccaagc 60 tgtgccttgg gtggctttgg ggcattggaca tcgaccctta taaagaattt
 ggagctactg 120 tggagttact ctcgtttttg ctttctgact tctttccttc agtacgagat
 cttctagata 180 ccgcctcagc tctgtatcgg gaagccttag agtctcctga gcattgttca
 cctcaccata 240 ctgcactcag gcaagcaatt ctttgctggg gggaactaat gactctagct
 acctgggtgg 300 gtgttaattt ggaagatcca gcgtctagag acctagtagt cagttatgtc
 aacactaata 360 tgggcctaaa gttcaggcaa ctcttgtggg ttacatttc ttgtctcact
 tttggaagag 420 aaacagttat agagtatttg gtgtctttcg gagtgtggat tcgcactcct

ccagcttata	480 gaccacaaa tgcccctatc ctatcaacac ttccggagac tactgttgtt
agacgacgag	540 gcaggtcccc tagaagaaga actccctcgc ctgcgagacg aaggtctcaa
tcgccgcgctc	600 gcagaagatc tcaatctcgg gaatctcaat gttagtattc cttggactca
taaggtgggg	660 aactttactg ggctttattc ttctactgta cctgtcttta atcctcattg
gaaaacacca	720 tcttttccta atatacattt acaccaagac attatcaaaa aatgtgaaca
gtttgtaggc	780 ccactcacag ttaatgagaa aagaagattg caattgatta tgcctgccag
gttttatcca	840 aaggttacca aatatttacc attggataag ggtattaaac cttattatcc
agaacatcta	900 gttaatcatt acttccaaac tagacactat ttacacactc tatggaaggc
gggtatatta	960 tataagagag aaacaacaca tagcgccica ttttgtgggt caccatattc
ttgggaacaa	1020 gatctacagc atggggcaga atctttccac cagcaatcct ctgggattct
ttcccagacca	1080 ccagttggat ccagccttca gagcaaacac cgcaaatcca gattgggact
tcaatcccaa	1140 caaggacacc tggccagacg ccaacaaggt aggagctgga gcattcgggc
tgggtttcac	1200 cccaccgcac ggaggccttt tgggggtggag ccctcaggct cagggcatac
tacaaacttt	1260 gccagcaaat cgcctcctg cctccaccaa tcgccagtca ggaaggcagc
ctaccccgt	1320 gtctccacct ttgagaaaca ctatcctca ggccatgcag tggaattcca
caaccttcca	1380 ccaaactctg caagatccca gagtgagagg cctgtatttc cctgctgggtg
gtccagttc	1440 aggaacagta aaccctgttc tgactactgc ctctccctta tcgtcaatct
tctcgaggat	1500 tggggaccct gcgctgaaca tggagaacat cacatcagga ttcttaggac
cccttctcgt	1560 gttacaggcg gggtttttct tgttgacaag aatcctcaca ataccgcaga
gtctagactc	1620 gtggtggact tctctcaatt ttctaggggg aactaccgtg tgtcttggcc
aaaattcgca	1680 gtccccaacc tccaatcact caccaacctc ttgtcctcca acttgtcctg

gttatcgctg	1740 gatgtgtctg cggcgtttta tcatcttctt cttcatcctg ctgctatgcc
tcatcttctt	1800 gttgggttctt ctggactatc aaggtatgtt gcccgtttgt cctctaattc
caggatcctc	1860 aacaaccagc acgggaccat gccggacctg catgactact gctcaaggaa
cctctatgta	1920 tccctcctgt tgctgtacca aaccttcgga cggaaattgc acctgtattc
ccatcccatc	1980 atcctgggct ttcggaaaat tcctatggga gtgggcctca gcccgtttct
cctggctcag	2040 ttactagtgc ccatttgttc agtgggtcgt agggctttcc cccactgttt
ggctttcagt	2100 tatatggatg atgtggtatt gggggccaag tctgtacagc atcttgagtc
cctttttacc	2160 gctgttacca attttctttt gtctttgggt atacatttaa accctaacaa
aacaaagaga	2220 tggggttact ctctaaattt tatgggttat gtcattggat gttatgggtc
cttgccacaa	2280 gaacacatca tacaaaaaat caaagaatgt tttagaaaac ttcctattaa
caggcctatt	2340 gattggaaag tatgtcaacg aattgtgggt cttttgggtt ttgctgcccc
ttttacacaa	2400 tgtggttata ctgcgttgat gcctttgtat gcatgtattc aatctaagca
ggctttcact	2460 ttctcgccaa cttaacaaggc ctttctgtgt aaacaatacc tgaaccttta
ccccgttgcc	2520 cggcaacggc caggtctgtg ccaagtgttt gctgacgcaa cccccactgg
ctggggcttg	2580 gtcatgggcc atcagcgcac gcgtggaacc ttttcggctc ctctgccgat
ccatactgcg	2640 gaactcctag ccgcttggtt tgctcgcagc aggtctggag caaacattat
cgggactgat	2700 aactctgttg tcctatcccg caaatataca tcgtttccat ggctgctagg
ctgtgctgcc	2760 aactggatcc tgccgaggac gtcctttgtt tacgtcccgt cggcgctgaa
tctgcggac	2820 gacccttctc ggggtcgctt gggactctct cgtccccttc tccgtctgcc
gttccgaccg	2880 accacggggc gcacctctct ttacgcggac tccccgtctg tgccttctca
tctgccggac	2940 cgtgtgcact tcgcttcacc tctgcacgtc gcatggagac caccgtgaac

gcccaccaaa	3000	tattgccc	aa	ggcttt	acat	aagagg	actc	ttggact	c	agcaat	gtca
acgaccgacc	3060	ttgagg	cata	cttcaa	agac	tg	ttt	gttta	aagact	ggga	ggagttgggg
gaggagatta	3120	ggttaa	aggt	ctttgt	acta	ggagg	ctgt	ggcata	aa	ggtct	gcgca
ccagcaccat	3180	gcaact	tttt	cacct	ctgcc	taat	catc	ctc	ttgtt	catgt	cctactgttc
aagcctccaa	3240	gctgtg	cctt	gggtg	gcttt	ggggc	atgga	catcg	accct	tataa	agaat
ttggagctac	3300	tgtgg	agtta	ctctc	gtttt	tg	cctt	ctga	cttct	ttcct	tcagtacgag
atcttctaga	3360	gggcc	cctatt	ctatag	tgtc	acctaa	atgc	tagagg	atct	ttgtga	agga
accttacttc	3420	tgtggt	gtga	cataat	tgga	caaact	acct	acagag	attt	aaagct	ctaa
ggtaaata	3480	aaat	tttta	gtgtat	aatg	tg	ttaa	acta	ctgatt	ctaa	ttgtttgtgt
attttagatt	3540	ccaac	tatg	gaact	gatga	atggg	agcag	tgg	tgga	atg	cctttaatga
ggaaaacctg	3600	ttttg	ctcag	aagaa	atgcc	atctag	tgat	gatgag	gcta	ctgctg	actc
tcaacattct	3660	actc	ctcaa	aaaaga	agag	aaaggt	tagaa	gaccc	caagg	actttc	cttc
agaattgcta	3720	ag	ttttt	tga	gtcat	gtgt	gtttag	taat	agaact	cttg	cttgctttgc
tatttacacc	3780	acaag	gaaa	aagct	gcact	gctata	caag	aaaatt	atgg	aaaaat	at
gatgtatagt	3840	gcctt	gacta	gagat	cataa	tcagc	catac	cacatt	tgt	gaggt	tttac
ttgctttaaa	3900	aaac	ctcca	cacct	cccc	tgaac	tga	acata	aaatg	aatgca	attg
ttgttgtaa	3960	ctt	gttt	tatt	gcag	cttata	atggt	tacaa	ataa	agcaat	agcatc
atttcacaaa	4020	taa	agcatt	ttt	ctact	gc	attctag	tgtg	tgg	ttt	gtcc
atgtatctta	4080	tc	atgt	cttg	atcat	ccgc	catggt	atca	acg	catatt	tctatt
gtagggacct	4140	ctt	cgtt	gtg	taggt	accgc	tgtatt	ccta	ggg	aaatag	agagg
tgaactgtct	4200	gcat	cagcca	tatag	cccc	gctgtt	c	gac	ttaca	aacac	aggc

ctgacaaacc	4260	catacacctc ctctgaaata cccatagttg ctagggctgt ctccgaactc
attacaccct	4320	ccaaagtcag agctgtaatt tcgcatcaa gggcagcgag ggcttctcca
gataaaatag	4380	cttctgccga gagtcccgta agggtagaca cttcagctaa tccctcgatg
aggtctacta	4440	gaatagtcag tgcggctccc attttgaaaa ttcacttact tgatcagctt
cagaagatgg	4500	cggagggcct ccaacacagt aattttcctc ccgactctta aaatagaaaa
tgtcaagtca	4560	gttaagcagg aagtggacta actgacgcag ctggccgtgc gacatcctct
tttaattagt	4620	tgctaggcaa cgccctccag agggcgtgtg gttttgcaag aggaagcaaa
agcctctcca	4680	cccaggccta gaatgtttcc acccaatcat tactatgaca acagctgttt
tttttagtat	4740	taagcagagg ccggggaccc ctgggccggc ccgcttactc tggagaaaaa
gaagagaggc	4800	attgtagagg cttccagagg caacttgtca aaacaggact gcttctattt
ctgtcacact	4860	gtctggccct gtcacaaggt ccagcacctc cataccccct ttaataagca
gtttgggaac	4920	gggtgcgggt cttactccgc ccatcccgcc cctaactccg ccagttccg
cccattctcc	4980	gccccatggc tgactaattt tttttattta tgcagaggcc gaggccgcct
cggcctctga	5040	gctattccag aagtagtgag gaggcTTTTT tggaggccta ggcttttgca
aaaagctaata	5100	tcggcgtaata ctgctgcttg caaacaacaaa aaccaccgct accagcggtg
gtttgtttgc	5160	cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga
gcgcagatac	5220	caaatactgt ctttctagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac
tctgtagcac	5280	cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt
ggcgataagt	5340	cgtgtcttac cgggttggaac tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag
cggtcgggct	5400	gaacggggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc
gaactgagat	5460	acctacagcg tgagcattga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaaag

gcggacaggt	5520	atccggttaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca
gggggaaacg	5580	cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt
cgatTTTTgt	5640	gatgctcgtc aggggggCGG agcctatgga aaaacgccag caacgcaagc
tagcttctag	5700	ctagaaattg taaacgttaa tattttgtta aaattcgCGT taaatttttg
ttaaatacagc	5760	tcatttttta accaataggc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa
agaatagccc	5820	gagatagggt tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa
gaacgtggac	5880	tccaacgtca aaggGCGaaa aaccgtctat caggGCGatg gccgcccact
acgtgaacca	5940	tcacccaaat caagtTTTTT ggggtcGagg tgccgtaaag cactaaatcg
gaaccctaaa	6000	gggagccccc gatttagagc ttgacgggga aagccggcga acgtggcgag
aaaggaaggg	6060	aagaaagcga aaggagcggg cgctagggcg ctggcaagtG tagcggtcac
gctgcgcgta	6120	accaccacac ccgccgcgct taatgcgccg ctacagggcg cgtactatgg
ttgctttgac	6180	gagaccgtat aacgtgcttt cctcgttgga atcagagcgg gagctaaaca
ggaggccgat	6240	taaagggatt ttagacagga acggtacgcc agctggatta ccaaaggGCC
tcgtgatacg	6300	cctattttta taggttaatg tcatgataat aatggtttct tagacgtcag
gtggcacttt	6360	tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt
caaatatgta	6420	tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa
ggaagagtat	6480	gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt
gccttcctgt	6540	ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt
tgggtgcacg	6600	agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaaagatc cttgagagtt
ttcgccccga	6660	agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgCGG
tattatcccg	6720	tgttgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga

atgacttggt	6780	tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa
gagaattatg	6840	cagtgtgcc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac ttactttctga
caacgatcgg	6900	aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa
ctcgccttga	6960	tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca
ccacgatgcc	7020	tgcagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc gaactactta
ctctagcttc	7080	ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac
ttctgcgctc	7140	ggcccttccg gctggctggt ttattgctga taaatctgga gccggtgagc
gtgggtctcg	7200	cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag
ttatctacac	7260	gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga
taggtgcctc	7320	actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt
agattgattt	7380	aaaacttcat ttttaatttc tctagcgcgt tgacattgat tattgactag
ttattaatag	7440	taatcaatta cggggtcatt agttcatagc ccatatatgg agttccgcgt
tacataactt	7500	acggtaaatg gcccgcctgg ctgaccgccc aacgaccccc gcccatlgac
gtcaataatg	7560	acgtatgttc ccatagtaac gccaataggg actttccatt gacgtcaatg
ggtggactat	7620	ttacggtaaa ctgcccactt ggcagtacat caagtgtatc atatgccaag
tacgccccct	7680	attgacgtca atgacggtaa atggcccgcc tggcattatg cccagtacat
gaccttatgg	7740	gactttccta ctggcagta catctacgta ttagtcatcg ctattaccat
ggtgatgcgg	7800	ttttggcagt acatcaatgg gcgtggatag cggtttgact cacggggatt
tccaagtctc	7860	caccccatg acgtcaatgg gagtttgitt tggcaccaaa atcaacggga
ctttccaaaa	7920	tgtcgtaaca actccgcccc attgacgcaa atgggcggtg ggcgtgtacg
gtgggaggtc	7980	tatataagca gagctctctg gctaact

8007 <210>; 4 <211>; 8717 <212>; DNA <213>;
 Artificial Sequence <220>; <223>; R711: pCMV-HBV/GFP Full Sequence
 <400>; 4 aactttttca cctctgccta atcatctctt gtcatgtcc tactgttcaa gcctccaagc
 60 tgtgccttgg gtggctttgg ggcatggaca tcgaccctta taaagaattt ggagctactg 120
 tggagttact ctcgtttttg ctttctgact tctttccttc agtacgagat cttctagata 180
 ccgcctcagc tctgtatcgg gaagccttag agtctcctga gcattgttca cctcaccata 240
 ctgcactcag gcaagcaatt ctttgctggg gggaactaat gactctagct acctgggtgg 300
 gtgttaattt ggaagatcca gcgtctagag acctagtagt cagttatgtc aacactaata 360
 tgggcctaaa gttcaggcaa ctcttgtggt ttcacatttc ttgtctcact ttggaagag 420
 aaacagttat agagtatttg gtgtctttcg gagtgtggat tcgcactcct ccagcttata 480
 gaccacaaa tgcccctatc ctatcaacac ttccggagac tactgttggt agacgacgag 540
 gcagggtccc tagaagaaga actccctcgc ctgcgagacg aaggtctcaa tcgccgcgtc 600
 gcagaagatc tcaatctcgg gaatctcaat gttagtattc cttggactca taaggtgggg 660
 aactttactg ggctttattc ttctactgta cctgtcttta atctcattg gaaaacacca 720
 tcttttccta atatacattt acaccaagac attatcaaaa aatgtgaaca gtttgtaggc 780
 ccactcacag ttaatgagaa aagaagattg caattgatta tgcctgccag gttttatcca 840
 aaggttacca aatatttacc attggataag ggtattaaac cttattatcc agaacatcta 900
 gttaatcatt acttccaaac tagacactat ttacacactc tatggaaggc gggtatatta 960
 tataagagag aaacaacaca tagcgcctca ttttgtgggt caccatattc ttgggaacaa 1020
 gatctacagc atggggcaga atctttccac cagcaatcct ctgggattct ttcccgacca 1080
 ccagttggat ccagccttca gagcaaacac cgcaaatcca gattgggact tcaatcccaa 1140

caaggacacc tggccagacg ccaacaaggt aggagctgga gcattcgggc tgggtttcac	1200
cccaccgcac ggaggccttt tggggtggag ccctcaggct cagggcatac taaaaacttt	1260
gccagcaaat ccgcctcctg cctccaccaa tcgccagtca ggaaggcagc ctaccccgt	1320
gtctccacct ttgagaaaca ctcatcctca ggagatgagt aaaggagaag aacttttcac	1380
tggagttgtc ccaattcttg ttgaattaga tggatgagtt aatgggcaca aattttctgt	1440
cagtggagag ggtgaaggtg atgcaacata cggaaaactt acccttaaatt ttatttgcac	1500
tactggaaaa ctacctgttc catggccaac acttgtcact actttctctt atgggtgttca	1560
atgcttttca agataccag atcatatgaa acagcatgac tttttcaaga gtgccatgcc	1620
cgaaggttat gtacaggaaa gaactatatt tttaaagat gacgggaact acaagacacg	1680
tgctgaagtc aagtttgaag gtgataccct tgttaataga atcgagttaa aaggtattga	1740
ttttaagaa gatggaaaca ttcttggaaca caaattggaa tacaactata actcacacaa	1800
tgtatacatc atggcagaca aacaaaagaa tggaatcaaa gttaacttca aaattagaca	1860
caacattgaa gatggaagcg ttcaactagc agaccattat caacaaaata ctccaattgg	1920
cgatggccct gtccttttac cagacaacca ttacctgtcc acacaatctg ccctttcgaa	1980
agatcccaac gaaaagagag accacatggt ccttcttgag ttgtaacag ctgctgggat	2040
tacacatggc atggatgaac tatacaaata aggaattcca caaccttcca ccaaactctg	2100
caagatccca gaggagagg cctgtatttc cctgctggtg gctccagttc aggaacagta	2160
aacctgttc tgactactgc ctctccctta tcgtcaatct tctcaggat tggggaccct	2220
gcgctgaaca tggagaacat cacatcagga ttcttaggac cccttctcgt gttacaggcg	2280
gggtttttct tgttgacaag aatcctcaca ataccgcaga gtctagactc gtggtggact	2340
tctctcaatt ttctaggggg aactaccgtg tgtcttggcc aaaattcgca gtccccaacc	2400

tccaatcact caccaacctc ttgtcctcca acttgtcctg gttatcgctg gatgtgtctg	2460
cggcgtttta tcatcttctt cttcatcctg ctgctatgcc tcatcttctt gttggttctt	2520
ctggactatc aaggtatgtt gcccgtttgt cctctaattc caggatcctc aacaaccagc	2580
acgggaccat gccggacctg catgactact gctcaaggaa cctctatgta tccctcctgt	2640
tgctgtacca aaccttcgga cggaaattgc acctgtattc ccatcccatc atcctgggct	2700
ttcggaaaat tcctatggga gtgggcctca gcccgtttct cctggctcag ttactagt	2760
ccatttggtc agtggttcgt agggctttcc cccactgttt ggctttcagt tatatggatg	2820
atgtggtatt gggggccaag tctgtacagc atcttgagtc cttttttacc gctgttacca	2880
atcttctttt gtctttgggt atacatttaa accctaacaa aacaaagaga tggggttact	2940
ctctaaattt tatgggttat gtcattggat gttatgggtc ctigccacaa gaacacatca	3000
tacaaaaaat caaagaatgt tttagaaaac ttctatttaa caggcctatt gattggaaag	3060
tatgtcaacg aattgtgggt cttttgggtt ttgtgcccc ttttacacaa tgtggttacc	3120
ctgcgttgat gcctttgtat gcatgtattc aatctaagca ggctttcact ttctcgccaa	3180
cttacaaggc ctttctgtgt aaacaatacc tgaaccttta ccccgttgcc cggcaacggc	3240
caggtctgtg ccaagtgttt gctgacgcaa cccccactgg ctggggcttg gtcattggcc	3300
atcagcgcat gcgtggaacc ttttcggctc ctctgccgat ccatactgcg gaactcctag	3360
ccgcttggtt tgctcgcagc aggtctggag caaacattat cgggactgat aactctgttg	3420
tcctatcccg caaatatata tcgtttccat ggctgctagg ctgtgctgcc aactggatcc	3480
tgcgcgggac gtcctttgtt tacgtcccggt cggcgctgaa tcctgcggac gacccttctc	3540
ggggtcgctt gggactctct cgtcccttc tccgtctgcc gttccgaccg accacggggc	3600
gcacctctct ttacgcggac tccccgtctg tgccttctca tctgccggac cgtgtgcact	3660

tcgcttcacc tctgcacgtc gcatggagac caccgtgaac gcccaccaa tattgccaa 3720
ggtcttacat aagaggactc ttggactctc agcaatgtca acgaccgacc ttgaggcata 3780
cttcaaagac tgtttgttta aagactggga ggagtgggg gaggagatta ggttaaaggt 3840
ctttgtacta ggaggctgta ggcataaatt ggtctgcgca ccagcaccat gcaacttttt 3900
cacctctgcc taatcatctc ttgttcatgt cctactgttc aagcctccaa gctgtgcctt 3960
gggtggcttt ggggcatgga catcgaccct tataaagaat ttggagctac tgtggagtta 4020
ctctcgtttt tgccttctga cttctttcct tcagtacgag atcttctaga gggccctatt 4080
ctatagtgtc acctaaatgc tagaggatct ttgtgaagga accttacttc tgtggtgtga 4140
cataattgga caaactacct acagagattt aaagctctaa ggtaaataa aaatttttaa 4200
gtgtataatg tgttaaacta ctgattctaa ttgtttgtgt attttagatt ccaacctatg 4260
gaactgatga atgggagcag tgggtggaatg cctttaatga ggaaaacctg ttttgctcag 4320
aagaaatgcc atctagtgt gatgaggcta ctgctgactc tcaacattct actcctccaa 4380
aaaagaagag aaaggtagaa gacccaagg actttccttc agaattgcta agttttttga 4440
gtcatgctgt gtttagtaat agaactcttg cttgctttgc tatttacacc acaaaggaaa 4500
aagctgcact gctatacaag aaaattatgg aaaaatattt gatgtatagt gccttgacta 4560
gagatcataa tcagccatac cacatttgta gaggttttac ttgctttaaa aaacctccca 4620
cacctcccc tgaacctgaa acataaaatg aatgcaattg ttgttgttaa cttgtttatt 4680
gcagcttata atggttacia ataaagcaat agcatcacia atttcacaaa taaagcattt 4740
ttttcactgc attctagtgt tggttgtcc aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg 4800
atcatcccgc catggtatca acgcatatt tctatttaca gtagggacct cttcgtttgt 4860
taggtaccgc tgtattccta gggaaatagt agaggcacct tgaactgtct gcatcagcca 4920

tatagcccc gctgttcgac ttacaaacac aggcacagta ctgacaaacc catacacctc	4980
ctctgaaata cccatagttg ctagggctgt ctccgaactc attacaccct ccaaagtcag	5040
agctgtaatt tcgccatcaa gggcagcgag ggcttctcca gataaaatag cttctgccga	5100
gagtcgccgta agggtagaca cttcagctaa tccctcgatg aggtctacta gaatagtcag	5160
tgcggctccc attttgaaaa ttactttact tgatcagctt cagaagatgg cggagggcct	5220
ccaacacagt aattttcttc cgcactctta aaatagaaaa tgtcaagtca gttaagcagg	5280
aagtggacta actgacgcag ctggccgtgc gacatcctct ttttaattagt tgctaggcaa	5340
cgccctccag agggcgtgtg gttttgcaag aggaagcaaa agcctctcca ccagggccta	5400
gaatgtttcc acccaatcat tactatgaca acagctgttt tttttagtat taagcagagg	5460
ccggggaccc ctgggccggc ccgcttactc tggagaaaaa gaagagaggc attgtagagg	5520
cttccagagg caacttgtca aaacaggact gcttctatit ctgtcacact gtctggccct	5580
gtcacaaggt ccagcacctc cataccccct ttaataagca gtttggaac ggggtgcgggt	5640
cttactccgc ccatcccgcc cctaactccg ccagttccg ccattctcc gccccatggc	5700
tgactaatit tttttatit tgcagaggcc gaggccgcct cggcctctga gctattccag	5760
aagtagtgag gaggtttit tggaggccta ggcttttgca aaaagcta ttcggcgtaat	5820
ctgtgcttg caaacaacaa aaccaccgct accagcggtg gtttgtttg cggatcaaga	5880
gtaccaact ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt	5940
ccttctagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgctacata	6000
cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac	6060
cgggttggaac tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg	6120
ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagc	6180

tgagcattga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaaag gcggacaggt atccggttaag	6240
cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct	6300
ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc	6360
aggggggcg agcctatgga aaaacgccag caacgcaagc tagcttctag ctagaaattg	6420
taaacgttaa tattttgtta aaattcgct taaatttttg ttaaatacgc tcatttttta	6480
accaataggc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa agaataggcc gagatagggt	6540
tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac tccaacgtca	6600
aaggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccgccact acgtgaacca tcacccaaat	6660
caagttttt ggggtcgagg tgccgtaaag cactaaatcg gaaccctaaa gggagcccc	6720
gatttagagc ttgacgggga aagccggcga acgtggcgag aaaggaaggg aagaaagcga	6780
aaggagcggg cgctagggcg ctggcaagt tagcggtcac gctgcgcgta accaccacac	6840
ccgccgcgt taatgcgccg ctacaggcg cgtactatgg ttgctttgac gagaccgtat	6900
aacgtgcttt cctcgttga atcagagcgg gagctaaaca ggaggccgat taaagggtt	6960
ttagacagga acggtacgcc agctggatta ccaaagggcc tcgtgatacg cctattttta	7020
taggttaatg tcatgataat aatggtttct tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat	7080
gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg	7140
agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gattattcaa	7200
catttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac	7260
ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac	7320
atcgaactgg atctcaacag cggttaagatc cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt	7380
ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg tgttgacgcc	7440

gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttggt tgagtactca 7500
ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgtgcc 7560
ataacatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag 7620
gagctaaccg cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa 7680
ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgcagcaatg 7740
gcaacaacgt tgcgcaaact attactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa 7800
ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttcg 7860
gctggctggt ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt 7920
gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt 7980
caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgtgaga taggtgcctc actgattaag 8040
catttgtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat 8100
ttttaatttc tctagcgcgt tgacattgat tattgactag ttattaatag taatcaatta 8160
cggggtcatt agttcatagc ccatatatgg agttccgcgt tacataactt acggtaaatg 8220
gcccgcctgg ctgaccgccc aacgaccccc gccattgac gtcaataatg acgtatgttc 8280
ccatagtaac gccaataggg actttccatt gacgtcaatg ggtggactat ttacggtaaa 8340
ctgcccactt ggcagtacat caagtgtatc atatgccaag tacgccccct attgacgtca 8400
atgacggtaa atggcccgcc tggcattatg ccagtacat gaccttatgg gactttccta 8460
cttggcagta catctacgta ttagtcatcg ctattacat ggtgatgcgg ttttggcagt 8520
acatcaatgg gcgtggatag cggtttgact cacggggatt tccaagctc cacccttg 8580
acgtcaatgg gagtttgttt tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa tgtcgtaa 8640
actccgcccc attgacgcaa atgggcggtg ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca 8700

gagctctctg gctaact 8717

<210> 5 <211> 7991 <212> DNA <213> Artificial
Sequence <220> <223> R712: pCMV-HBV/GFP3.2 Full Sequence <400>

5 aactttttca cctctgccta atcatctctt gttcatgtcc tactgttcaa gcctccaagc 60

tgtgccttgg gtggctttgg ggcatggaca tcgaccctta taaagaattt ggagctactg 120

tggagttact ctctgttttg ccttctgact tctttccttc agtacgagat cttctagata 180

ccgcctcagc tctgtatcgg gaagccttag agtctcctga gcattgttca cctcaccata 240

ctgcactcag gcaagcaatt ctttgctggg gggaactaat gactctagct acctgggtgg 300

gtgttaattt ggaagatcca gcgtctagag acctagtagt cagttatgtc aacactaata 360

tgggcctaaa gttcaggcaa ctcttgtggg ttacatttc ttgtctcact tttggaagag 420

aaacagttat agagtatttg gtgtctttcg gagtgtggat tcgcactcct ccagcttata 480

gaccaccaa tgcccctatc ctatcaacac ttccggagac tactgttggt agacgacgag 540

gcaggtcccc tagaagaaga actccctcgc ctgcgagacg aaggtctcaa tcgccgcgtc 600

gcagaagatc tcaatctcgg gaatctcaat gttagtattc cttggactca taaggtgggg 660

aactttactg ggctttattc ttctactgta cctgtcttta atcctcattg gaaaacacca 720

tcttttccta atatacattt acaccaagac attatcaaaa aatgtgaaca gttttaggc 780

ccactcacag ttaatgagaa aagaagattg caattgatta tgcctgccag gttttatcca 840

aaggttacca aatatttacc attggataag ggtattaaac cttattatcc agaacatcta 900

gttaatcatt acttccaaac tagacactat ttacacactc tatggaaggc gggtatatta 960

tataagagag aaacaacaca tagcgcctca ttttgtgggt caccatattc ttgggaacaa 1020

gatctacagc atggggcaga atctttccac cagcaatcct ctgggattct ttcccgaaca 1080

ccagttggat ccagccttca gagcaaacac cgcaaatcca gattgggact tcaatcccaa	1140
caaggacacc tggccagacg ccaacaaggt aggagctgga gcattcgggc tgggtttcac	1200
cccaccgcac ggaggccttt tggggtggag ccttcaggct cagggcatac tacaaacttt	1260
gccagcaaat ccgcctcctg cctccaccaa tcgccagtca ggaaggcagc ctaccccgt	1320
gtctccacct ttgagaaaca ctcctcctca ggagatgagt aaaggagaag aacttttcac	1380
tggagttgtc ccaattcttg ttgaattaga tggatgatgtt aatgggcaca aattttctgt	1440
cagtggagag ggtgaaggtg atgcaacata cggaaaactt acccttaaata ttatttgcac	1500
tactggaaaa ctacctgttc catggccaac acttgtcact actttctctt atgggtgttca	1560
atgcttttca agatacccag atcatatgaa acagcatgac tttttcaaga gtgccatgcc	1620
cgaaggttat gtacaggaaa gaactatatt tttaaagat gacgggaact acaagacacg	1680
tgctgaagtc aagtttgaag gtgataccct tgttaataga atcgagttaa aaggtattga	1740
ttttaaagaa gatggaaaca ttcttggaca caaattggaa tacaactata actcacacaa	1800
tgtatacatc atggcagaca aacaaaagaa tggaatcaaa gttaacttca aaattagaca	1860
caacattgaa gatggaagcg ttcaactagc agaccattat caacaaaata ctccaattgg	1920
cgatggccct gtccttttac cagacaacca ttacctgtcc acacaatctg ccctttcgaa	1980
agatccaac gaaaagagag accacatggt cttctttgag tttgtaacag ctgctgggat	2040
tacacatggc atggatgaac tatacaaata aggaattctt cagttatatg gatgatgtgg	2100
tattgggggc caagtctgta cagcatcttg agtccctttt taccgtgtt accaattttc	2160
ttttgtcttt gggtatacat ttaaacccta acaaaacaaa gagatgggggt tactctctaa	2220
attttatggg ttatgtcatt ggatgttatg ggtccttgcc acaagaacac atcatacaaa	2280
aatcaaaga atgtttttaga aaacttccta ttaacaggcc tattgattgg aaagtatgtc	2340

aacgaattgt gggctctttg ggttttgctg ccccttttac acaatgtggt tatcctgcgt	2400
tgatgccttt gtatgcatgt attcaatcta agcaggcttt cactttctcg ccaacttaca	2460
aggcctttct gtgtaaacia taccigaacc ttatccccgt tgcccggcaa cggccaggtc	2520
tgtgccaagt gtttgctgac gcaacccccca ctggctgggg ctggtcatg ggccatcagc	2580
gcatgcgtgg aaccttttcg gctcctctgc cgatccatac tgcggaactc ctagccgctt	2640
gttttgctcg cagcaggctt ggagcaaaca ttatcgggac tgataactct gttgtcctat	2700
cccgcaaata tacatcgttt ccatggctgc taggctgtgc tgccaactgg atcctgcgcg	2760
ggacgtcctt tgtttacgtc ccgtcggcgc tgaatcctgc ggacgacct tctcggggtc	2820
gcttgggact ctctcgtccc ctctcctgc tgcggttccg accgaccacg gggcgcacct	2880
ctctttacgc ggactccccg tctgtgcctt ctcatctgcc ggaccgtgtg cacttcgctt	2940
cacctctgca cgtcgcattg agaccaccgt gaacgccac caaatattgc ccaaggtctt	3000
acataagagg actcttgac tctcagcaat gtcaacgacc gaccttgagg catacttcaa	3060
agactgtttg tttaaagact gggaggagt ggaggaggag attaggttaa aggtctttgt	3120
actaggaggc tgtaggcata aattggtctg cgcaccagca ccatgcaact ttttcacctc	3180
tgcctaata tctcttgctc atgtcctact gttcaagcct ccaagctgtg ccttgggtgg	3240
ctttggggca tggacatcga cccttataaa gaatttggag ctactgtgga gttactctcg	3300
tttttgctt ctgacttctt tccttcagta cgagatcttc tagaggggcc tattctatag	3360
tgtcacctaa atgctagagg atctttgtga aggaacctta ctctgtggt gtgacataat	3420
tggacaaact acctacagag atttaaagct ctaaggtaaa tataaaattt ttaagtgtat	3480
aatgtgttaa actactgatt ctaattgttt gtgtatttta gattccaacc tatggaactg	3540
atgaatggga gcagtgtggt aatgccttta atgaggaaaa cctgttttgc tcagaagaaa	3600



tgccatctag tgatgatgag gctactgctg actctcaaca ttctactcct ccaaaaaaga	3660
agagaaaagg agaagacccc aaggactttc cttcagaatt gctaagtttt ttgagtcatg	3720
ctgtgttttag taatagaact ctgtcttgct ttgctattta caccacaaag gaaaaagctg	3780
cactgctata caagaaaatt atggaaaaat atttgatgta tagtgccttg actagagatc	3840
ataatcagcc ataccacatt thtagagggt ttacttgctt taaaaaacct cccacacctc	3900
cccctgaacc tgaaacataa aatgaatgca attgttggtg ttaacttggt tattgcagct	3960
tataatgggt acaaataaag caatagcatc acaaatttca caaataaagc atttttttca	4020
ctgcattcta gttgtggttt gtccaaactc atcaatgtat cttatcatgt ctggatcatc	4080
ccgccatggt atcaacgcca tatttctatt tacagtaggg acctcttcgt tgtgtaggta	4140
ccgctgtatt cctagggaaa tagtagaggc accttgaact gtctgcatca gccatatagc	4200
ccccgctggt cgacttacaa acacaggcac agtactgaca aaccataca cctcctctga	4260
aatacccata gttgctaggg ctgtctccga actcattaca cctccaaag tcagagctgt	4320
aatttcgcca tcaagggcag cgagggttc tccagataaa atagcttctg ccgagagtcc	4380
cgtaagggtg gacacttcag ctaatccctc gatgaggtct actagaatag tcagtgcggc	4440
tcccatittg aaaattcact tacttgatca gttcagaag atggcggagg gcctccaaca	4500
cagtaatttt cctcccgact cttaaaatag aaaatgtcaa gtcagttaag caggaagtgg	4560
actaactgac gcagctggcc gtgcgacatc ctcttttaat tagttgctag gcaacgcctt	4620
ccagagggcg tgtggttttg caagaggaag caaaagcctc tccacccagg cctagaatgt	4680
ttccacccaa tcattactat gacaacagct gtttttttta gtattaagca gaggccgggg	4740
acccttgggc cggcccgctt actctggaga aaaagaagag aggcattgta gaggcttcca	4800
gaggcaactt gtcaaaacag gactgcttct atttctgtca cactgtctgg ccctgtcaca	4860

aggtccagca cctccatacc ccctttaata agcagtttgg gaacgggtgc gggctttact	4920
ccgccccatcc cgcccctaac tccgcccagt tccgcccatt ctccgccccca tggctgacta	4980
atTTTTTTta tttatgcaga ggccgaggcc gcctcggcct ctgagctatt ccagaagtag	5040
tgaggaggct tttttggagg cctaggcttt tgcaaaaagc taattcggcg taatctgctg	5100
cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc	5160
aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct	5220
agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc	5280
tctgctaate ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt	5340
ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggctg ggctgaacgg ggggttcgtg	5400
cacacagccc agcttggagc gaacgaccta caccgaactg agatacctac agcgtgagca	5460
ttgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag	5520
ggtcggaaaca ggagagcgca cgaggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatag	5580
tcctgtcggg tttcgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg	5640
gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc aagctagctt ctagctagaa attgtaaacg	5700
ttaatatTTT gttaaaattc gcgttaaatt tttgttaaatt cagctcattt tttaaccaat	5760
aggccgaaat cggcaaaatc ccttataaat caaaagaata gcccgagata gggttgagtg	5820
ttgttccagt ttggaacaag agtcactat taaagaacgt ggactccaac gtcaaagggc	5880
gaaaaaccgt ctatcagggc gatggccgcc cactacgtga accatcacc aaatcaagtt	5940
ttttggggtc gaggtgccgt aaagcactaa atcggaaccc taaagggagc ccccgattta	6000
gagcttgacg gggaaagccg gcgaacgtgg cgagaaagga agggaagaaa gcgaaaggag	6060
cgggcgctag ggcgctggca agtgtagcgg tcacgtgcg cgtaaccacc acacccgccg	6120

cgcttaatgc gccgctacag ggcgcgtact atggttgctt tgacgagacc gtataacgtg	6180
ctttcctcgt tggaatcaga gcgggagcta aacaggaggc cgattaaagg gattttagac	6240
aggaacggta cgccagctgg attaccaaag ggcctcgtga tacgcctatt tttataggtt	6300
aatgtcatga taataatggt ttcttagacg tcagggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc	6360
ggaacccta tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa	6420
taaccctgat aaatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc	6480
cgtgtcgccc ttattccctt ttttgcgga ttttgccttc ctgtttttgc tcaccagaa	6540
acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa	6600
ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg tttccaatg	6660
atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtgttga cgccgggcaa	6720
gagcaactcg gtcgccgat acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc	6780
acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc	6840
atgagtgata aactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta	6900
accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag	6960
ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgcagc aatggcaaca	7020
acgttgcgca aactattaac tggcgaacta ctactctag cttcccggca acaattaata	7080
gactggatgg aggcgataa agttgcagga ccacttctgc gctcgccct tccggtggc	7140
tggttttattg ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctgcggtat cattgcagca	7200
ctggggccag atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtccagca	7260
actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg	7320
taactgtcag accaagttta ctcatatata cttagattg atttaaaact tcatttttaa	7380

tttctctagc gcgttgacat tgattattga ctagttatta atagtaatca attacggggt	7440
cattagttca tagcccatat atggagtcc gcgttacata acttacggta aatggcccg	7500
ctggctgacc gccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag	7560
taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga ctatttacgg taaactgccc	7620
acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg	7680
gtaaatggcc cgcctggcat tatgcccagt acatgacctt atgggacttt cctacttggc	7740
agtacatcta cgtattagtc atcgttatta ccatggatgat gcggttttgg cagtacatca	7800
atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca	7860
atgggagttt gttttggcac caaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg	7920
ccccattgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga ggtctatata agcagagctc	7980
tctggctaac t	7991